生命科学名著

〔英〕R. 赫尔 编著
范在丰 李怀方
韩成贵 李大伟 等 译校



(原书第四版)

马修斯 植物病毒学

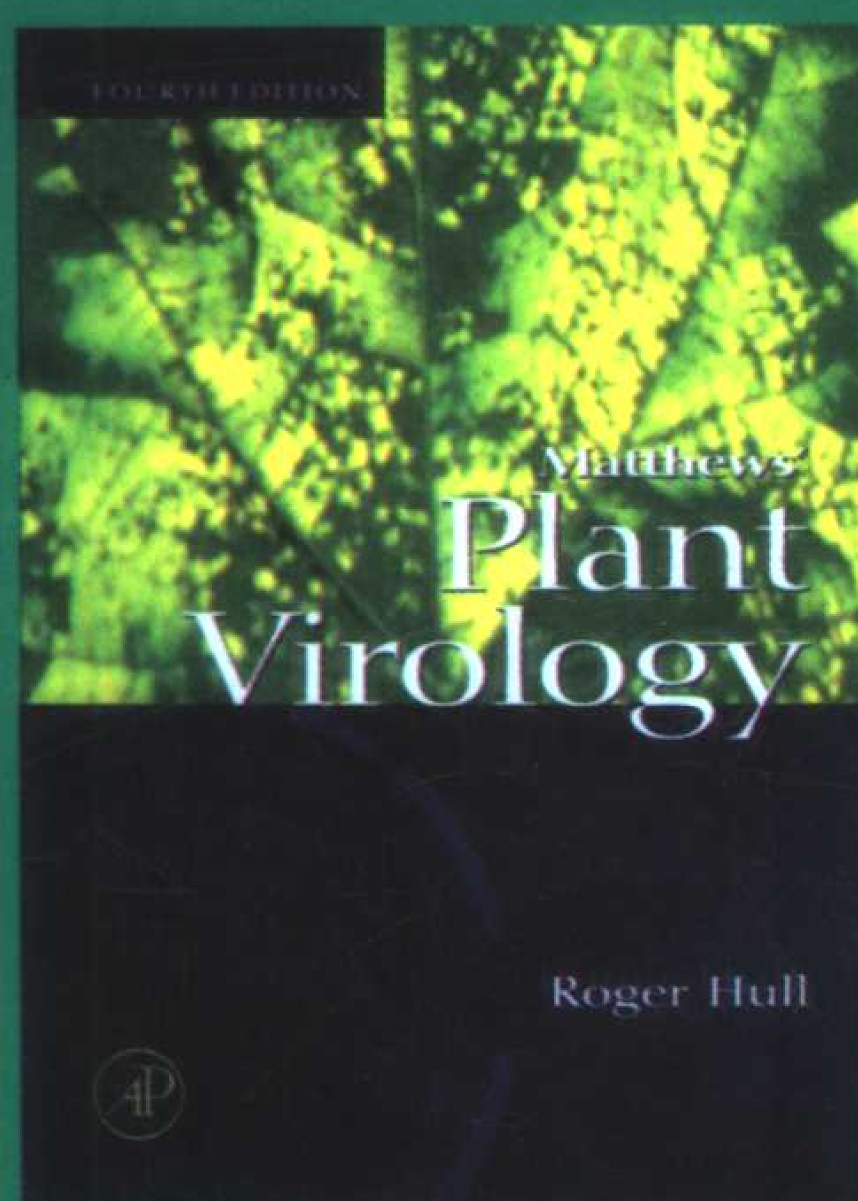
Matthews' Plant Virology

(Fourth Editon



科学出版社
www.sciencep.com

ELSEVIER



自从高度成功的《马修斯植物病毒学》第三版出版以来的十年间，植物病毒学领域有了令人瞩目的发展。现在这部受到读者厚爱与敬重的专著由Roger Hull执笔又得到了更新、重新组织与设计。这部新著作除增加了大量彩色图版外，还详细介绍了这个发展迅速的领域中许多重要的新进展，包括生物与生态植物病毒学、植物基因工程、分子病毒学、分子结构以及寄主与病毒互作的多方面的内容。

《马修斯植物病毒学》是一部经典著作，是植物病毒学、植物病理学、普通病毒学、植物生理学和微生物学专业方向的学生、教师或对这些领域感兴趣的爱好者的优秀教材；在分子生物学、生物化学、与昆虫学相关领域工作的科学家也会发现这部著作是宝贵的参考书。

本书的主要特点

- 介绍了病毒分类的新进展
- 对每个属和科均做了简要介绍
- 罗列了所有已知的病毒属的基因组结构图
- 在世界范围内植物病毒导致的经济损失
- 病毒如何复制其基因组
- 用于病毒病害控制的基因工程抗性策略
- 病毒转基因的生物安全考虑
- 相关的基因操纵与其他基因技术
- 病毒结构与装配的新发现
- 有关病毒在植株内部和植株之间移动的新观点
- 对病毒与植物互作的新理解
- 包括50余幅彩色图片的新图版

ISBN 978-7-03-017159-7


生命科学编辑部
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail:lifescience@mail.sciencep.com

销售分类建议：生物/植物学；微生物学

定 价：150.00 元

马修斯植物病毒学

（原书第四版）

〔英〕R. 赫尔　编著

范在丰　李怀方　韩成贵　李大伟 等 译校

科学出版社

北　京

图字：01-2004-3033 号

内 容 简 介

自从《马修斯植物病毒学》第三版出版以来的十年间，植物病毒学领域又有了令人瞩目的发展。这部得到读者厚爱的专著现在由罗杰·赫尔（Roger Hull）教授执笔又得以及时更新。《马修斯植物病毒学》第四版除增加了大量彩色图版外，还详细介绍了这个发展迅速的领域中许多重要的新进展，包括生物学与生态植物病毒学、植物基因工程、分子病毒学、分子结构以及寄主与病毒互作等多方面的内容。

《马修斯植物病毒学》是一部经典著作，是植物病毒学、植物病理学、普通病毒学、植物生理学和微生物学专业方向的学生、教师或对这些领域感兴趣的爱好者的优秀教材；在分子生物学、生物化学与昆虫学相关领域工作的科学家也会发现这部力作是他们所需的宝贵参考书。

图书在版编目(CIP)数据

马修斯植物病毒学（原书第四版）/（英）赫尔编著；范在丰等译校．北京：科学出版社，2007
（生命科学名著）

ISBN 978-7-03-017159-7

Ⅰ．马… Ⅱ．①赫… ②范… Ⅲ．植物病毒 Ⅳ．S432.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2006）第 037963 号

责任编辑：王 静 盖 宇 李秀伟 彭克里 席 慧/责任校对：张 琪
责任印制：钱玉芬/封面设计：陈 敬

科学出版社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

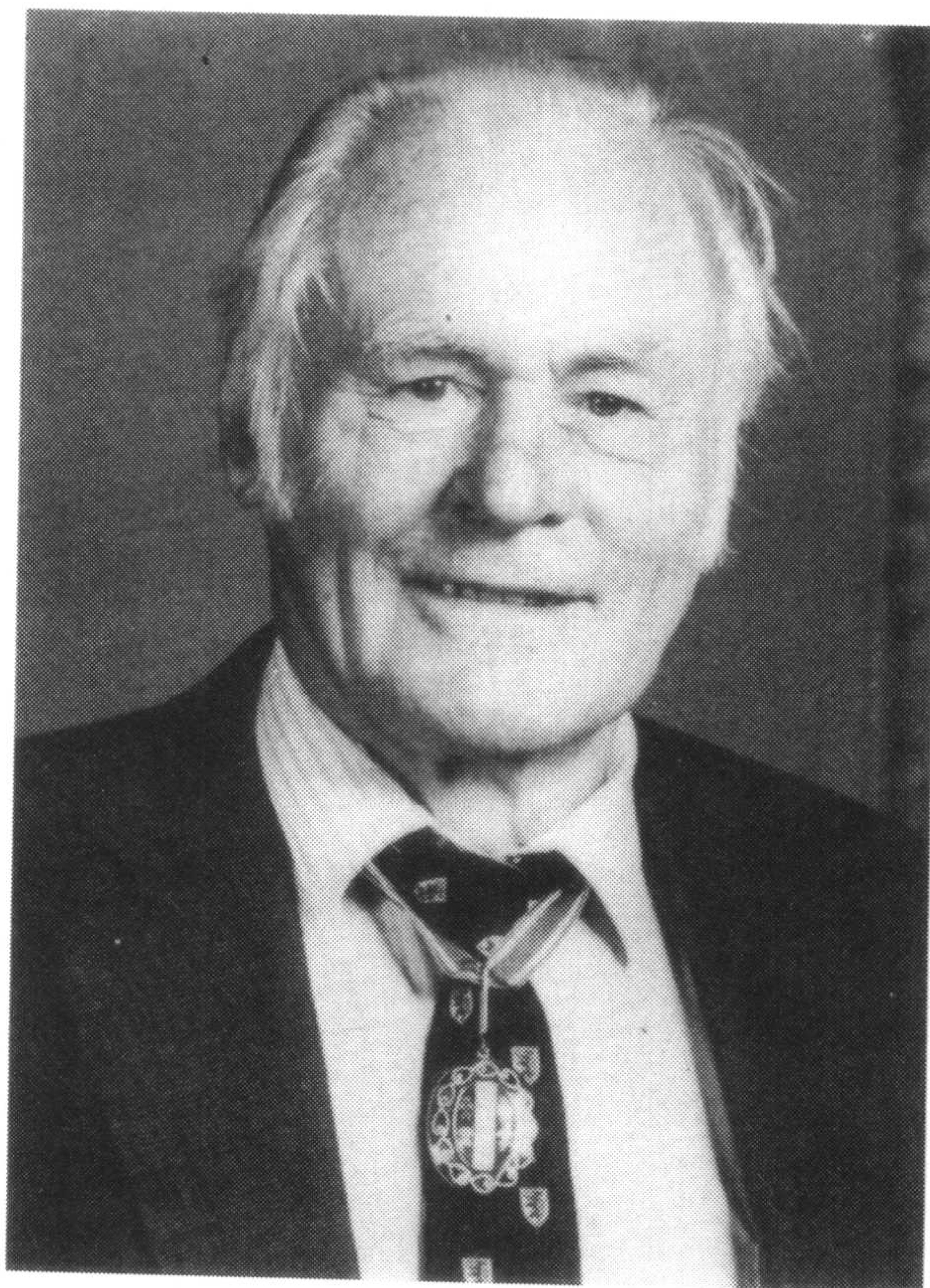
天时彩色印刷有限公司印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 1 月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2007 年 1 月第一次印刷 印张：70 1/2
印数：1—3 000 字数：1 592 000

定价：150.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换〈双青〉）



Richard Ellis Ford Matthews
(1921—1995)

"The farther backwards you can look,
the farther forward you are likely to see."

对历史的追溯愈久远，对未来的展望才可能更有远见

——温斯顿·丘吉尔（Winston Churchill）

作者简介



罗杰·赫尔（Roger Hull）于1960年毕业于剑桥大学植物学专业。随后在伦敦大学Wye学院学习植物病毒流行学，于1964年获得博士学位。1960～1965年，他在该学院讲授农业植物学课程。

1964年，他被调入位于乌干达坎帕拉的Makerere大学讲授了热带农业植物学，同时也研究了花生丛簇病（groundnut rosette disease）的流行学。通过观察降落到花生植株上的蚜虫，加深了他对病毒扩散到田间的边际效应（edge effect）的理解。1965年他加入了剑桥病毒研究所Roy Markham博士的课题组，研究了一系列病毒，特别是紫花苜蓿花叶病毒的生物物理和生物化学特性。在1968年他与Markham一起转到位于诺里奇（Norwich）的约翰·英尼斯研究所（John Innes Institute）后这项研究也未中断。在那里，赫尔博士成为课题项目负责人和病毒研究系的副主任。1974年，他在美国加州大学戴维斯分校（UC Davis）度过了其学术休假年，与Bob Shepherd博士一起研究了花椰菜花叶病毒（CaMV）的特性。在那里，他学习、应用了早期的分子生物学技术，并由此改变了他的研究方向。回到约翰·英尼斯研究所后，他用分子生物学的方法研究CaMV，阐明了该病毒的复制需经过反转录阶段，这是第一个被证明有此特性的植物病毒。此外，罗杰还参与了洛克菲勒基金会资助的水稻生物技术项目，这又唤起了他对热带农业问题的兴趣，他领导着一个大课题组系统地研究了导致水稻东格鲁病（rice tungro）的两种病毒。他还提倡利用转基因技术来控制病毒病，并一直处于与此相关的生物安全性问题研究的前沿。在将研究的重点从水稻转移至香蕉（大蕉）之后，他的课题组发现香蕉线条病毒（BSV）的基因组整合进了寄主的基因组中；在某些香蕉品种中BSV的整合体被激活后发生了游离体侵染（episomal infection），这也是在植物病毒方面的首次发现。他在1997年因达到了法定退休年龄而退休。

赫尔博士是英国东英吉利大学（University of East Anglia）和北京大学的荣誉教授、法国Perpignan大学的荣誉博士以及美国植物病理学会的理事。现在，赫尔博士作为荣誉研究员在约翰·英尼斯研究中心（John Innes Centre）继续研究BSV，并且一直倡导在发展中国家采用转基因技术以缓解食品短缺问题。他的业余爱好主要是从事园艺、观鸟、旅行，以及与子孙们在一起享受天伦之乐等。

中文版序

编写本书前三版的作者马修斯（R. E. F. Matthews）可以说是植物病毒学的同义词。1995年迪克·马修斯的去世不仅是植物病毒学界，也是整个科学界的一个重大损失。由Bellamy（*Virology* 1995；209，287；*Virology* 1995；211，598；*Arch. Virol.* 1995；140，1885）以及Harrison（*Biographical Memories of Fellows of the Royal Society* 1999；45，297～313）撰写的讣告详述了马修斯对植物病毒学的贡献。本版（第四版）即是为纪念他而修订的。

迄今《植物病毒学》基本上是每隔10年出一次新的版本，本版也是如此。但这是翻译成中文的第一个版本，旨在帮助中国的科学工作者们处于植物病毒学研究的前沿领域。就农业和食品生产而言，不仅在中国，而且在世界范围内运用先进的知识和技术以减轻病毒病害造成的损失具有日益重要的意义。

如该书前几版的序言所述，每一版都编入了在植物病毒领域不断增多的新进展。上一个10年的发展也是如此，发展的速度甚至以指数形式递增。这主要源于以下几种技术：能够克隆并表达植物病毒RNA或DNA基因组的能力，能够表达整合（转化）进植物基因组的病毒（或其他）序列的能力以及观察植物细胞中病毒行为所用的非破坏性技术。

在过去10年中，植物病毒的分类更加合理化，一些分类单元如属和种的概念，已被广泛接受。分类信息的增加已经导致，并且还会增加命名的难度，这也是国际病毒分类委员会（ICTV）需解决的问题。例如，某些可造成某种作物的相似症状的病毒分离株存在大量核苷酸变异。这些应视为一个种还是几个种呢？如果是几个种，对不同种的病毒的划分有没有通用的标准呢？当今在病毒分类学中应用的大量数据已经使我们将植物病毒分为70个属977种，而10年前只有35个属（组）590种。除一个属外，至今已获得其他所有属代表性病毒的基因组全序列。

从序列数据中我们可以更深入地理解病毒编码的基因以及这些基因如何在植物中以可控制的方式得以表达。序列数据也将加深我们对病毒进化，特别是重组在病毒进化中所起作用的理解。

通过转化技术表达整合到植物基因组中的病毒序列拓宽了我们对病毒基因功能的理解，开辟了利用病毒序列来保护植物免受目标病毒侵袭的新领域。这已揭示了一个前所未知的、在植物和其他生物中普遍存在的抗性系统，并且正在开辟在抗病性及基因组学等不同领域利用这些系统的途径。

过去10年的迅猛发展促使本版需要进行大量的改写和重新组织。但我认为保留第三版的一些内容是很重要的，因为这些内容描述了研究多年的一些现象，而这些现象是理解新近认识的一些机制的基础。作者希望本版体现了本学科发展的动态性，而且也在本书多处指出了今后可能会被证实具有科学价值的研究方向。各个章节是在前面章节信

息的基础上编排而成，旨在逻辑性地引导读者认识该学科。

本书前几章介绍了植物病毒学学科，简要描述了各组群病毒的概况，它们的粒体结构及基因组组构（结构）的原则。这为后续章节在分子信息方面的阐述（如病毒基因表达和复制的机制以及病毒基因组如何与寄主基因组互作等）奠定了基础。

在详述了病毒从一个寄主转移到另一个寄主的方式后，第13章汇总了一种病毒充分发挥功能时涉及的各种互作。在介绍类似病毒的病原（如类病毒和卫星病毒等）一章之后，随后几章分别讨论了病毒的检测、控制和进化。

本版的360余张插图中有60%以上是新添加的，并且像第一版一样，还包括数十幅彩色插图。参考书目也从第三版的3000多篇增加到本版的4500篇左右。为了记住在植物病毒学领域的一些突出贡献，许多“较老的”重要文献也被保留下来。在其他部分，则建议读者参阅综述性文章以便限制参考文献的总数目。此外，还列出了一些非病毒学领域的，然而有助于理解病毒与其寄主和传播介体互作的参考文献。

很多同行与作者就很多问题进行了探讨，并提供了尚未发表的材料做参考，对此本人深表谢意。本人对妻子詹妮弗（Jennifer）永远心存感激，因为她容忍了家里随处可见的成堆书稿，并一直给予有力的支持。

罗杰·赫尔（Roger Hull）
2004年6月于英国诺里奇（Norwich）

Preface for the Chinese Edition

Plant Virology is synonymous with the name of R. E. F Matthews, who wrote the first three editions of this standard text. It was a great loss, not only to the plant virology community, but also to the scientific community as a whole, that Dick Matthews died in 1995. Obituaries to Dick Matthews published at that time by Bellamy (*Virology* 1995; 209, 287; *Virology* 1995; 211, 598; *Arch. Virol*. 1995; 140, 1885) and Harrison (*Biographical Memories of Fellows of the Royal Society* 1999; 45, 297-313) describe his contribution to plant virology. This edition is dedicated to his memory.

New editions of *Plant Virology* have been published at 10-year intervals, the fourth edition is following this timing. However, this is the first edition to be translated into Chinese and it is hoped that the translated version will help Chinese scientists to work at the forefront of this subject. It is of increasing importance to agriculture and food production, not only in China but worldwide, that advanced techniques and knowledge are applied to reducing the losses due to virus diseases.

As was noted in the prefaces for previous editions, each has chronicled ever-increasing advances in the subject. This last decade has been no exception-if anything, the rate of progress has increased almost exponentially. The advances have been due to several technologies, including the ability to clone and manipulate plant viral genomes, be they RNA or DNA, the ability to express viral (and other) sequences integrated (transformed) into the plant genome, and non-destructive techniques for observing the behaviour of the virus within the plant cell.

Over the last 10 years, the classification of plant viruses has been rationalized with the general acceptance of taxa such as genera and species. With the increase of taxonomic information, this has led to, and is continuing to raise, difficulties of definition, which the International Committee on the Taxonomy of Viruses have to resolve. For instance, it is becoming increasingly apparent that there is considerable nucleotide variation in isolates of certain viruses that cause similar symptoms in a specific (crop) plant. Should these be considered as one or several species and, if the latter, are there common criteria for viruses from different species. The wealth of data used in virus taxonomy has now allowed 977 species in 70 genera to be recognized, compared with the 590 species (viruses) and 35 genera (groups) of 10 years ago. The genomes of representatives of all but one of the genera have now been fully sequenced.

From the sequence data has come a greater understanding of the genes that viruses encode and how these genes are expressed in a controlled manner within the plant. The sequence data have also given a clearer understanding into virus evolution and especially the role played by recombination.

The expression of viral sequences integrated into plant genomes by transformation techniques has broadened the understanding of viral gene function and opened up the

field on using viral sequences to confer protection against target viruses. This, in turn, has revealed a previously unknown generic resistance system in plants and other organisms, and is opening up the way to capitalize on this system in areas as different as disease resistance and genomics.

These rapid developments over the past decade have necessitated a substantial rewriting and reorganization of this edition. However, I have considered it important to retain material from the third edition giving description of phenomena studied over the years as these can, and do, form the basis of understanding newly recognized mechanisms. I hope to have expressed the dynamism of the subject and I have tried in various places to point to future directions that may prove to be scientifically profitable. The chapters are now arranged to lead the reader through the subject logically, building on information from previous chapters.

I have started with an introduction to the subject and a description of each group of viruses, the principles of the architecture of their particles and their genome organizations. This lays the ground for the molecular information given in subsequent chapters, such as the mechanisms by which viral genomes are expressed and replicated, and how the genomes interact with host genomes.

The description of how viruses move from host to host is followed by a chapter that brings together the various interactions involved in the full functioning of a virus. After a chapter on virus-like agents such as viroids and satellites, virus detection, control and evolution are discussed.

Over 60% of the more than 360 illustrations are new, including several in colour, as in the first edition. The reference list has been expanded from about 3000 in the previous edition to about 4500 in this. In the spirit of remembering important contributions to the subject, many of the important "older" references are retained. In other places, references to reviews are used to limit the overall number. References are also given to some non-virological subjects that are important in understanding the interactions of viruses with their hosts and vectors.

I am greatly indebted to a large number of colleagues for their helpful discussion on various topics and for access to pre-publication material. My eternal gratitude goes to my wife, Jennifer, who has tolerated the "piles of papers" all over the house and who has given me continuous support.

Roger Hull
Norwich, UK
June 2004

谢联辉序

由国际著名植物病毒学家马修斯（R. E. F. Matthews）所著的《植物病毒学（*Plant Virology*）》自1970年出版以来，大约每10年更新一次，一直是国际上植物病毒和植物病理学界广泛使用和备受欢迎的研究生教材或重要参考书。该书第四版由英国John Innes Centre的植物病毒学家Roger Hull教授续写，书名改为《马修斯植物病毒学（*Matthews' Plant Virology*）》。全书长达上千页，包含17章正文和多个附录，并且收录了数百个图表、4500多篇参考文献，堪称内容丰富，有广度、有深度的一部好书。

该书由我国植物病毒学大师裘维蕃院士创建的研究室——中国农业大学植物病毒室主持翻译，译校者在植物病毒学领域有丰富的教学、科研经历。译稿较好地处理了原著中的专业术语和病毒名称的统一问题，使读者在学过本书后可以方便地阅读英文版专著或论文；另外，根据国际病毒分类委员会（ICTV）的第八次分类报告，对原著的相关部分做了相应的修改和补充也是很合时宜的。译稿共约八十余万字，九百多页；凝聚了译校者大量的辛勤劳动。

该书同时具有结构框架经典、内容全面新颖、方便检索使用等特点，是植物病理学、病毒学、分子生物学等领域师生的一部经典教科书，也是生命科学包括农林科学、医学及相关领域工作者的一部很好的参考书。为此，乐以为序。

谢联辉

中国科学院院士
福建农林大学植物病毒研究所
2006年10月

译 者 的 话

在《马修斯植物病毒学》第四版中文版即将付梓之际，我们感慨万千，心情难以平静。

国际著名植物病毒学家马修斯（R. E. F. Matthews）的《植物病毒学》一书自从1970年出版以来，大约每10年出一次新版，第一版至第三版一直是国际上广泛使用的研究生教材与参考书。马修斯博士仙逝后，由英国John Innes Centre的Roger Hull教授续写的《马修斯植物病毒学》第四版又面世了。本书涉及了植物病毒学的各个领域，内容新颖。鉴于该书的篇幅大、涉及面广、专业术语多，对我国的学生甚至相关专业工作者而言，若要深入、准确地理解其中的内容难免会有一定的困难。为此，我们组织了一批植物病毒学工作者翻译了本书，以期作为我国植物病理学和病毒学以及相关专业的学生、教师与研究人员的参考书。

为了使读者熟悉植物病毒学常用的英文术语以便在读完本书后可以直接阅读英文版专著或论文，我们尽量在专业术语的译文后面附上英文原词或短语；由于历史的原因，一些病毒科、属或种名的中文译名不止一种，为了使读者正确理解与记忆，我们时常加上相应的英文标准名称或常用名称。例如，马铃薯Y病毒属（*Potyvirus*），马铃薯Y病毒属病毒（成员）（potyviruses或potyvirus）。

在本书的翻译接近完成时，国际病毒分类委员会（ICTV）的第8次分类报告已正式出版，为了使本书有关分类的内容不致过时，我们又根据新的分类报告对译稿做了相应的修改与补充。

一般的病毒科、属的中文名称是基于前人拟定的译名，选择应用较多或较合理而简洁的名称。对于新建立的科、属的中文译名，则根据标准（英文）名称的含义与ICTV所做的解释以准确、简洁为原则加以拟定。例如，"*Flexiviridae*"是新成立的一个病毒科，根据其词源含义暂译为"曲线病毒科"，可以与已有的"长线病毒科"（*Closteroviridae*）相对应。

一些英文术语有两种或多种译名，如"variant"可译为"变株"、"变体"等，本书采用"变株"；"strain"一律译为"株系"；"virion"一词有多种译名，本书采用"病毒粒体"；而"virus particle"若指有侵染性的完整粒子，则本书一般仍译为"病毒粒体"，否则就译为"病毒粒子"；"viroplasm"有多种译名，本书采用"病毒质"。

此外，原书中有一些文字或图表的印刷错误、不一致的用法或一些现已过时的名称，我们在译文中均做出了直接更正与修改，但限于篇幅只在个别地方加了译者注。

本书各部分的主要翻译及审校人员如下：

译者：第1章，范在丰；第2章，范在丰、曹言勇、陈利；第3章与第4章，陈红运；第5章，陈招荣、李菁博；第6章，李萃、郭晓芬、王颖；第7章，王献兵；第8章，李旻、翟亚锋；第9章，周涛；第10章，周涛、林彩丽、范在丰；第11章，林彩

丽、秦艳红；第12章，曹言勇、施艳、燕照玲、乔岩、刘冬梅、王忠运；第13章，王远宏、范在丰；第14章，古勤生；第15章，隋春；第16章，程玉琴；第17章，李向东；序言、附录等，周岩、任保田；部分图表，王颖、陈招荣、施艳、燕照玲、乔岩、刘冬梅等。

校阅者：韩成贵（第5、8章）；李大伟（第6、7章）；李怀方（第15、16章）；范在丰，其余各章，全书统稿。

本书的翻译出版凝聚了许多前辈与同仁的心血，我们特别感谢中国科学院微生物研究所的田波院士与中国农业科学院植物保护研究所的周广和研究员，是他们首先建议我们翻译此书并向科学出版社倾力推荐。在翻译过程中，得到了国内外许多同仁的关心与支持，例如，为本书作序的谢联辉院士、本书原作者 Roger Hull 教授、中国农业大学的刘仪教授、彭友良教授、于嘉林教授、彩万志教授、南京农业大学许志刚教授以及浙江大学的周雪平教授等，在此一并表示衷心的感谢。最后感谢国家重点基础研究发展计划项目（批准文号2006CB101903）的有力支持。

本书涉及的知识面极其广博，因译者的知识与翻译经验所限，虽力求尽善尽美，但译文中难免存在一些错漏或欠妥之处，恳请读者给予批评指正（E-mail：virology@cau.edu.cn）。

范在丰　李怀方　韩成贵　李大伟

中国农业大学植物病毒研究室

农业生物技术国家重点实验室

2006年12月于北京

英文版前言

编写本书前三版的作者马修斯（R. E. F. Matthews）可以说是植物病毒学的同义词。1995年迪克·马修斯的去世不仅是植物病毒学界，也是整个科学界的一个重大损失。由Bellamy（Virology 1995；209，287；Virology 1995；211，598；Arch. Virol. 1995；140，1885）以及Harrison（Biographical Memories of Fellows of the Royal Society 1999；45，297～313）撰写的讣告详述了马修斯对植物病毒学的贡献。本版（第四版）即是为纪念他而修订的。

迄今《植物病毒学》基本上是每隔十年出一次新的版本，本版也是如此。如该书前几版的序言所述，每一版都编入了在植物病毒领域不断增多的新进展。上一个十年的发展也是如此，发展的速度甚至以指数形式递增。在图1.3中显示的每年相关出版物的数目清楚地表明了这一点。这主要源于以下几种技术：能够克隆并表达植物病毒RNA或DNA基因组的能力，能够表达整合（转化）进植物基因组的病毒（或其他）序列的能力以及观察植物细胞中病毒行为所用的非破坏性技术。

在过去十年中，植物病毒的分类更加合理化，一些分类单元如属和种的概念，已被广泛接受。分类信息的增加已经导致、并且还会增加命名的难度，这也是国际病毒分类委员会（ICTV）需解决的问题。例如，某些可造成某种作物的相似症状的病毒分离株存在大量核苷酸变异。这些应视为一个种还是几个种呢？如果是后者，对不同属的病毒分类有没有通用的标准呢？当今在病毒分类学中应用的大量数据已经使我们将植物病毒分为70个属977种，而10年前只有35个属（组）590种。除一个属外，现已获得其他所有属代表性病毒的基因组全序列。

从序列数据中我们可以更深入地理解病毒编码的基因以及这些基因如何在植物中以可控制的方式得以表达。序列数据也将加深我们对病毒进化，特别是重组在病毒进化中所起作用的理解。

通过转化技术表达整合到植物基因组中的病毒序列拓宽了我们对病毒基因功能的理解，开辟了利用病毒序列来保护植物免受目标病毒侵袭的新领域。这已揭示了一个前所未知的、在植物和其他生物中普遍存在的抗性系统，并且正在开辟在抗病性及基因组学等不同领域利用这些系统的途径。

过去十年的迅猛发展促使本版需要进行大量的改写和重新组织。但笔者认为保留第三版的一些内容是很重要的，因为这些内容描述了研究多年的一些现象，而这些现象是理解新近认识的一些机制的基础。作者希望本版本体现了本学科发展的动态性，而且也在本书多处指出了今后可能会被证实具有科学价值的研究方向。各个章节是在前面章节信息的基础上编排而成，旨在逻辑性地引导读者认识该学科。

本书前几章介绍了植物病毒学学科，简要描述了各组群病毒的概况，它们的粒体结构及基因组组构（结构）的原则。这为后续章节在分子信息方面的阐述（如病毒基因组表达和复制的机制以及病毒基因组如何与寄主基因组互作等）奠定了基础。

在详述了病毒从一个寄主转移到另一个寄主的方式后，其第13章汇总了一种病毒充分发挥功能时涉及的各种互作。在介绍类似病毒的病原（如类病毒和卫星病毒等）一章之后，随后几章讨论了病毒的检测、控制和进化。

本版的360余张插图中有60%以上是新添加的，并且像第一版一样，还包括数十幅彩色插图。参考书目也从第三版的3000多篇增加到本版的4500篇左右。为了记住在植物病毒学领域的一些突出贡献，许多“较老的”重要文献也被保留下来。在其他部分，建议读者参阅综述性文章以便限制参考文献的总数目。此外，还列出了一些非病毒学领域的，然而有助于理解病毒与其寄主和传播介体互作的参考文献。

很多同行们与作者就很多问题进行了探讨，并提供了尚未发表的材料做参考，对此本人深表谢意。本人对妻子詹妮弗永远心存感激，因为她容忍了家里随处可见的成堆书稿，并一直给予鼓励。

罗杰·赫尔（Roger Hull）
2001年5月

目　　录

第1章　概　　述

第Ⅰ节　历史背景

对植物病毒病害的科学研究始于19世纪末期。然而，有关此类病害的文字与图画记载却早得多。几乎可以确定是一种病毒病害的最早的文字记载是日本皇太后共幸（Koken）在公元752年写的一首诗，其大意是：

在这个村庄

仿佛在不停地下着霜

因为我看到了一种植物

在夏日的田野里

绿色的叶片正在变黄

这种名为林泽兰（*Eupatorium lindleyanum*）的植物现在已知易受到TLCV* 的侵染，产生黄化症状（Osaki *et al.*, 1985）。

在公元1600～1660年时期的西欧，许多绘画作品都表现了显病毒病症的郁金香花。在这一时期的药用植物志（Parkinson，1656）以及一些画家如Ambrosius Bosschaert的早期的静物画中也有这方面的记载。在这个时期，呈现如此条纹图案的花朵被珍视为特别的品种，因而导致了“郁金香热”现象（Blunt，1950；Pavord，1999）。受侵染的郁金香鳞茎的贸易曾导致了严重的通货膨胀，因为鳞茎转手需要大量的钱或物（表1.1）。

表1.1　郁金香热：一个郁金香（Viceroy品种）的鳞茎曾经可以兑换的物品

4吨小麦	4桶啤酒
8吨黑麦	2桶黄油
4头肥牛	1000磅乳酪
8头肥猪	一张床及配套用品
12只肥羊	一套服装
2桶葡萄酒	一只银杯

Lawrence（1714）曾做过有关无意识地进行病毒传播实验的最早的书面记载。他详细地描述了一种茉莉病毒病的嫁接传播过程。该描述对他的实验的主要的目而言是偶然的，因为他本来是想要证明汁液一定能在植物体内流动。Blair（1719）曾描述了该实验的操作步骤而且相当悲伤地表示，即使在科学处于萌芽阶段时，实验者已经开始争论

* 病毒名称的缩写见附录1。

有关发现的优先权的事：

将一个带条纹的芽嫁接（接种）到普通砧木上，结果数年之后在接穗上下的整个茉莉植株出现了条纹或杂色，这是汁液可以循环的充分证明。虽然劳伦斯先生暗示好像是他首先发现了这种现象（Lawrence，1714），但是住在肯辛顿的 Wats 先生在此 18 年前就已首先观察到这种现象；Fairchild 先生在 9 年前亲自做了验证；Bradly 先生说他曾观察这种现象达数年之久。

在 19 世纪后半叶，侵染性病害是由微生物所引起的观点已经确立，亦可得到已知的细菌病原不能通过的滤器。Mayer（1886）（图 1.1）描述了他称之为 *Mosaikkrankheit*（花叶病）的一种烟草病害。他证实了通过接种来自发病植株的提取液，可以将该病害传染至健康的植物。Iwanowski（1892）证明了表现（Mayer 描述过的）病害症状的烟草植株的汁液在用细菌透不过的滤器过滤之后仍然具有侵染性。



图 1.1　左：Martinus Willem Beijerinck（1851～1931）；右：Adolf Eduard Mayer（1843～1942）。原照片来自荷兰 Wageningen 农业大学历史文献（收藏）馆，谨致谢意。

这项工作直到被 Beijerinck（1898）（图 1.1）重复后才引起广泛注意，他将该侵染性因子称为“*contagium vivum fluidum*”（拉丁文：传染性活液）以区别于其他颗粒性侵染性因子（图 1.2）。

Beijerinck 的发现标志着病毒学的诞生，在这一发现百年之际，出版了一些书刊并召开了系列会议以资纪念（Zaitlin，1998；Bos，1999a；2000a；Harrison and Wilson，1999a；Scholthof *et al.*，1999；van Kammen，1999）。

Baur（1904）表明苘麻的侵染性彩斑（variegation）可通过嫁接传播，但是不能通过机械接种传播。Beijerinck 和 Baur 在描述这些病害的致病因子时均使用了术语“virus”（病毒）以区别于细菌。在此之前，病毒这个术语与早期研究者曾用过的另一术语细菌几乎是同义词。随着更多的这类病害的发现，其未知的致病因子开始被称为“filterable viruses”（滤过性病毒）。

图 1.2 W. M. Beijerinck 于 1898 年研究 TMV 的实验记录中的一页（© Kluyver Institute）。承蒙荷兰 Delft 大学图书馆长 Lesley Robertson 提供，谨致谢意。

Johnson（1942）将 Mayer、Iwanowski、Beijerinck 和 Baur 的有关论文翻译为英文。

1900～1935 年，已有许多被认为是由滤过性病毒导致的植物病害的报道，但是引起了相当严重的混乱，因为当时尚未建立区分不同病毒的适当方法。病毒的最初标准是一类有传染性的实体（entity），能够通过可以阻挡所有已知的细胞性病原的、孔径很小的过滤器。然而，不久又发现了一些具有类似病毒病的症状，不和任何在光学显微镜下可见的病原相关，却不能经过机械接种传播的病害。对于此类病害，可滤过性（filterability）的标准无法应用。其侵染性可通过嫁接传播，有时通过昆虫介体来确定。因此出现了在缺乏充分证据时将某些具有黄化或丛枝（witches'broom）症状的病害如翠菊黄化（aster yellows）归因于病毒的情况。许多类似的病害现在知道是由菌原体（mycoplasma）类寄生物，如植原体（phytoplasma）和螺原体（spiroplasma）所引起，例如，甘蔗的根出芽矮化症（ratoon stunting）是细菌侵染的结果。

一个重要的实际进展是认识到一些病毒可由昆虫在植株间传播。Fukushi（1969）记录了一位日本水稻栽培者于 1883 年曾用叶蝉（*Recelia dorsalis*）传播 RDV 的事实。然而，这一工作未以任何方式发表，因此几乎不为人所知。Kunkel（1922）首次报道了

用飞虱传播病毒，在此后10年间，有许多昆虫病毒介体的报道。

1900～1935年这个时期的大部分时间里注意力主要集中在有关病害的描述，如宏观症状与光学显微镜检所显示的细胞学畸形、病原的寄主范围与传播方式。人们为了更准确地定义病毒的大小，曾做过改进过滤方法这样相当无效的尝试。这些几乎就是用当时的技术可以对病毒病害加以研究的仅有的一些研究工作。各种不同的物理和化学因子对病毒侵染性的影响方面也有一些研究，但是测定侵染性材料的方法相当原始。Holmes（1929）表明下列的一些寄主经机械接种后产生的局部斑（local lesion）可用于对侵染性病毒进行快速定量分析。这项技术使得对病毒特性的研究更加容易，在数年之后为病毒的分离和纯化创造了条件。

在1930年前，人们对于病毒本身和病毒导致的病害一直混淆不清。这并不令人惊讶，因为当时除了知道病毒很小以外，对病毒的其他方面基本上一无所知。Smith（1931）在这方面做出了一项重要贡献，帮助澄清了这种情形。在从事马铃薯病毒病害研究工作时，他认识到了使用指示植物的必要性。这些指示植物是一些与马铃薯不同的植物种类，它们对马铃薯中的各种病毒产生不同的反应。他使用了几种新奇的生物学方法将不同的病毒分开，并证明许多马铃薯病毒病是由不同性质的、他分别命名为X和Y的两种病毒的组合所引起。病毒X不能经桃蚜（*Myzus persicae*）传播，而病毒Y则可以由该蚜虫传播。通过这种方式，他获得了未混有病毒X的病毒Y。两种病毒均可通过穿刺针接种传播，但是Smith发现某些茄科植物对病毒Y有抗性。例如，通过将两种病毒的混合物用穿刺针接种到曼陀罗（*Datura stramonium*）植株上，获得了未混有病毒Y的病毒X。此外，Smith观察到来自不同植物的病毒X在各种不同的寄主上产生的症状严重度差异显著。Smith（1931）写道：

就马铃薯花叶病而言，有两个因素引起了目前的混乱。首先是一些花叶病类型的马铃薯病毒病的双重性，其次是这些病害的一个重要因子X的致病力（virulence）有波动。

Beale（1928）做出了另外一项很重要的发现，即受花叶病侵染的烟草植物中含有一种特异性的抗原。Gratia（1933）证明不同病毒侵染的植物中含有不同的特异性抗原。Chester（1935，1936）表明TMV和PVX的不同株系可以用血清学方法加以区别。他还证明，用血清学方法可以粗略估计病毒的浓度。

自从Fukushi（1940）首先证明RDV可经介体叶蝉的卵传播持续多个世代以来，人们对一些病毒能够在植物和昆虫体内复制的可能性产生了很大的兴趣。现在都知道弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）、呼肠病毒科（*Reoviridae*）、纤细病毒属（*Tenuivirus*）以及玉米细条病毒属（*Marafivirus*）的植物病毒既可在其寄主植物中增殖，也可在其传播介体昆虫中增殖。

因为提取和纯化蛋白质的方法在早期尚未有效建立起来，所以某些病毒在其侵染的植物中的高浓度及其相对稳定性对于最初病毒的分离和化学鉴定具有极端重要性。1926年，第一个酶——脲酶（urease），作为一种蛋白质被分离、结晶和鉴定（Sumner，1926）。随后其他酶的分离陆续成功。在20世纪30年代早期，各个国家的研究人员使用与分离、纯化酶类似的方法开始尝试分离、纯化植物病毒。在翔实的化学研究表明TMV这种传染性的因子可能是一种蛋白质时，Stanley（1935）宣布他成功地分离了这

一明显处于结晶态的病毒。最初 Stanley (1935, 1936) 认为该病毒是一种不含磷的球蛋白。而 Bawden 等 (1936) 随后报道，从 TMV 侵染的植物中分离出了液晶态的 (liquid crystalline) 含有戊糖类型核酸的核蛋白。他们表明 TMV 粒体是杆状的 (rod-shaped)，因此证实了较早前 Takahashi 和 Rawlins (1932) 基于含有 TMV 的溶液表现流体非均质性 (anisotropy) 的观察而提出的建议。Best (1936a) 记载了将受侵染叶片的提取物经酸化处理后，一种有病毒活性的像球蛋白一样的蛋白质沉淀出来；在 1937 年他独立地证实了 TMV 的核蛋白性质 (Best, 1937b)。

电子显微术 (electron microscopy) 和 X 射线结晶学 (X-ray crystallography) 是早期探索病毒结构的主要技术，而且这些方法的重要性一直持续至今日。Bernal 和 Fankuchen (1937) 对纯化的 TMV 制剂应用了 X 射线分析法。他们获得了病毒 (粒体) 杆宽度的准确估值，而且表明用盐使病毒沉淀产生的、有规则地进行二维排列的针形体应为准晶体 (paracrystal) 而非真晶体。随后分离了其他的杆状病毒，以及形成真晶体的球状病毒。这些实验都证明病毒由蛋白质和戊糖核酸组成。

早期的电子显微照片 (Kausche *et al.*, 1939) 证实了 TMV 是杆状的，而且显示了大致的体积，但是由于病毒粒体和支持膜之间缺乏对比度，因此结构不太清楚。重金属投影技术的建立 (Müller, 1942; Williams and Wycoff, 1944) 对确定病毒粒体的整体大小和形状非常有用。然而，金属的覆盖或多或少模糊了结构细节。在 20 世纪 50 年代随着高分辨率显微镜和负染色法 (negative staining) 的建立，电子显微镜术成为研究病毒亚结构 (substructure) 的一项重要工具。

从对 TYMV 制剂中病毒核蛋白的理化特性和空的病毒蛋白外壳的一项比较研究中，Markham (1951) 得出结论认为，病毒的 RNA 肯定存在于蛋白质外壳内；这个观点已经被对该种及其他病毒的 X 射线结晶学研究而充分证实。Crick 和 Watson (1956) 提出小病毒的蛋白质外壳由很多相同的亚基组成，这些亚基可排列成螺旋状的杆 (helical rod) 或立体对称性的球壳。后来的 X 射线结晶学和化学的研究工作已经证实了这种观点。Caspar 和 Klug (1962) 建立了一个普通理论，界定了形成较小的等径病毒外壳的蛋白质亚基的可能数目和排列方式。我们对具有较复杂对称结构的较大病毒的新知识来自使用负染法和超薄切片法的电子显微技术。

在 1948 年前，人们的大多数注意力集中于病毒的蛋白质部分。就数量而言，蛋白质构成了病毒制剂的大部分。当时已知在细胞内执行重要功能的酶是蛋白质，而有关戊糖核酸的知识则是十分粗浅。戊糖核酸在细胞中的功能尚不为人所知，并且它们通常被认为是小分子。这是因为当时未认识到 RNA 很易受到酸、碱以及经常污染病毒制剂的酶的水解。Markham 和 Smith (1949) 分离出了 TYMV，并证明其纯化的制剂包含两类粒体：一类侵染性的核蛋白含有大约 35%的 RNA，另一类显然具有同样的蛋白质粒子但不含有 RNA 而且不具有传染性。这一个结果清楚地表明了病毒的 RNA 对其生物学活性的重要性。分析研究 (Markham and Smith, 1951) 证明，不同病毒的 RNA 有特征性差异的碱基组成，而相关的病毒碱基组成相似。大约在此时，人们开始认识到病毒的 RNA 可能比原来预想的要大得多。

Hershey 和 Chase (1952) 的实验强调了核酸在病毒复制中的重要性：当大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 被一个细菌病毒 (噬菌体) 侵染时，病毒的 DNA 进入了寄主细胞

而大部分蛋白质被留在外面。Harris 和 Knight（1952）证明用酶促法从 TMV 中去掉 7% 的苏氨酸不改变病毒的生物学活性，而且用这些去苏氨酸的病毒接种会产生具有完全苏氨酸含量组分的正常病毒。当将一种人工合成的正常碱基鸟嘌呤的类似物（analogue）—— 8-氮鸟嘌呤（8-azaguanine）应用于受侵染植物中时，被掺入进 TMV 和 TYMV 的 RNA 中，并替代了一些鸟嘌呤。含有该同系物的病毒制剂比正常病毒侵染性低的事实（Matthews，1953c）进一步表明病毒的 RNA 对侵染性是重要的。然而，正是 Gierer 和 Schramm（1956），Fraenkel-Conrat 和 Williams（1955）以及 Fraenkel-Conrat（1956）的这些经典实验，直接证明了裸露的 TMV RNA 的侵染性以及蛋白质外壳的保护作用。这些发现预示了现代植物病毒学时代的来临。本节的下述部分将概述过去 45 年的主要发展过程。

蛋白质（胰岛素）的第一个氨基酸序列在 1953 年完成测定。在此后不久，TMV 外壳蛋白的 158 个氨基酸的全序列也被确定（Anderer *et al.*，1960；Tsugita *et al.*，1960；Wittmann and Wittmann-Liebold，1966）。许多自然发生的株系以及人工诱导的突变体的序列也大约在同期被确定。该工作对于确立遗传密码的通用性和我们对突变的化学基础的理解是一个重要的贡献。

Brakke（1951，1953）为纯化病毒建立了密度梯度离心法（density gradient centrifugation）。这是病毒学和分子生物学领域中一项有影响的技术进展。随着对影响提取物中病毒稳定性的化学因素的理解加深，这一实验程序已经使许多病毒得以分离和鉴定。蔗糖密度梯度分部分离（density gradient fractionation）的利用使 Lister（1966，1968）发现了 TRV 基因组的二分体性质。自那时起，密度梯度和聚丙烯酰胺凝胶分部分离技术已经使许多具有多分体基因组（multipartite genome）的病毒得以鉴定。他们的发现又开辟了对植物病毒进行遗传（基因）重配（reassortment）实验的可能性（Lister，1968；van Vloten-Doting *et al.*，1968）。

一些其他病毒提纯制剂的密度梯度分部分离法已经揭示了包含亚基因组 RNA 的非侵染性的核蛋白粒子。已发现与其他一些病毒（辅助病毒）相伴随的卫星病毒（satellite virus）或卫星 RNA，它们在复制期间依赖辅助病毒为其提供一些功能。鉴于上述各种可能性，实际上很难得到只包含一种类型粒体的、提纯的病毒制剂。

20 世纪 60 年代是电子显微镜术在促进我们对病毒结构和复制的了解方面占绝对优势的 10 年。为电子显微镜术制备超薄切片的方法改进使得直接观察细胞内的完整病毒粒体成为现实。在受侵染的细胞内，也可对病毒所诱导的结构的形成和定位加以研究。显然许多不同的组与科的病毒可诱发产生特异性的结构或病毒质（viroplasm）以便于病毒组分的复制和病毒粒体的装配。从负染的病毒粒体的电镜图像中提取结构数据的改良技术为“球状”病毒的结构揭示了在最初的二十面体主题上一些出人预料且有趣的变异。

在 20 世纪 70 年代又有了进一步的发展。与 X 射线结晶学分析相关的改良技术和对外壳蛋白氨基酸序列的知识的不断增加使得一些植物病毒的蛋白质外壳三维结构的分子细节被阐明。

数十年来，植物病毒复制的研究曾经远远落后于细菌病毒和脊椎动物病毒。这主要是因为当时没有适当的植物系统可使所有的细胞同时被病毒侵染以便为同时性“一步生长（曲线）”实验提供基础。然而，通过模仿 Cocking（1966）的早期实验，Takebe 和

同事为研究植物病毒的复制建立了原生质体系统（Takebe，1977）。虽然这些系统曾有明显的局限性，但是它们大幅地加深了我们对涉及植物病毒复制的过程的理解。另一项技术上的重要进展是蛋白质的体外合成系统如麦胚（wheat germ）的应用，在麦胚系统中，许多植物病毒的 RNA 可作为高效的信使（mRNA）合成蛋白质。这些系统的应用使借助生物化学方法为植物病毒的基因组作图成为可能。

在 20 世纪 80 年代，主要的进展为诊断病毒病方法的改良，集中体现在血清学技术与基于核酸杂交的一些方法上。自从 Clark 与 Adams（1977）的开创性工作以来，ELISA 技术已经发展出多种形式用于植物病毒高灵敏度的分析与检测。有关抗 TMV 的单克隆抗体（monoclonal antibody，MAb）的研究工作，Dietzen 和 Sander（1982）以及 Briand 等（1982）已做过介绍。从那时起，为了多种植物病毒的研究与诊断，单克隆抗体的应用有了非常迅速的增加。

在 20 世纪 70 年代后期和 20 世纪 80 年代也见证了应用分子生物学技术建立其他鉴定病毒的方法的开始，增进了我们对病毒基因组的结构和策略的理解，以及一些技术的建立可能为一些病毒病的控制提供新的方法。

可对大量样本进行高灵敏度测定的核酸杂交方法的应用得益于两项技术：①用来自病毒的基因组 RNA 制备双链 cDNA 并使其在细菌中增殖的质粒中复制，以及用放射性或非放射性的报道分子（reporter molecule）标记 cDNA 成为敏感的探针（probe）的技术；②斑点印迹（dot blot）法：用少量含病毒的植物粗提液样品与标记的探针杂交，最后在一张硝酸纤维素（nitrocellulose）膜或其他的材料上形成一个斑点。聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR），亦取决于基因组序列的详细信息，正日益广泛地应用于病毒病诊断中。

RNA 病毒的基因组核苷酸全序列测定技术的建立增进了我们对病毒的基因组结构与功能的理解。尤其重要的是我们用克隆的病毒 cDNA 在体外制备 RNA 病毒的侵染性转录物（infectious transcript）的能力（Ahlquist *et al.*，1984b）。这使得定点诱变（site-directed mutagenesis）这样的技术已被应用于基因组功能的研究。核苷酸序列数据已经，而且还将继续对我们理解植物病毒学的许多方面有深远的影响，它们包括下列各项：①病毒基因组中基因的定位、数目和大小；②已知的或推断的基因产物的氨基酸序列；③基因产物转录的分子机制；④基因产物的可能功能，通常可以通过与某些病毒编码的已知功能产物的氨基酸序列相似性推测出来；⑤基因组中调控病毒基因的表达和基因组复制的控制与识别序列；⑥对类病毒（viroid）以及伴随某些病毒的卫星 RNA 的结构与复制的理解；⑦病毒变异和进化的分子基础，包括对重组是 RNA 病毒中一种普遍现象的认识，以及了解病毒除可以从其他病毒获得基因外，也能获得寄主的核苷酸序列；⑧以进化关系为基础的病毒分类。

在 20 世纪 80 年代早期，人们曾设想，一些植物病毒经基因操纵（gene manipulation）技术加以适当改造后，可能会成为将外源基因导入植物的有用载体（vector）。虽然就模式实验中用的一些基因而言这个目的已经达到，但是该概念尚未表现出任何实际应用的重要性。然而，已经发现一些植物病毒包含的某些调控序列在其他的基因载体系统中非常有用。

在 20 世纪的早期，控制田间病毒病的尝试通常是无效的。它们主要限于一般作物

的田园卫生、除掉明显受到侵染的植株以及寻找遗传性抗病品系。自这一个时期以后的多方面进展已经为一些病毒病害的控制提供了可能。两类土传（soil-borne）病毒介体——线虫（Hewitt *et al.*，1958）与真菌（Grogan *et al.*，1958）的发现为控制一系列重要病害开辟了新的途径。在寻找对病毒的有效抗性或耐受性（tolerance）方面，在多种作物上已经陆续取得成功。

热处理（heat treatment）和分生组织顶端（茎尖）培养（meristem tip culture）方法已经被用于愈来愈多地应用于营养繁殖的植物上，以提供无病毒的（virus-free）核心原种（nucleus）并在可使再侵染（reinfection）减到最低的环境条件下加以繁殖。如此的进展时常涉及检疫证书制（certification scheme）的建立。在种植时有时施用颗粒剂型的内吸性（systemic）杀虫剂，以便控制以持久性方式（persistent manner）传毒的蚜虫介体。现已证明在蚜虫的前肠（foregut）中或口针（stylet）上以非持久性方式（non-persistent manner）传播的病毒病更加难以控制。人们逐渐认识到，在一定区域的某种特定作物上，病毒病的有效控制通常需要一个综合而持续的涉及多种控制措施的计划。然而，这样的综合控制的项目尚未得到广泛应用。

交互保护（cross-protection）（即弱株系保护）是一种植物受到病毒的一种弱株系（mild strain）侵染后可避免或延迟受该病毒强株系（severe strain）侵染的现象。此现象用于某些病毒病的控制已经取得了一定程度的成功，但是使用该方法尚存在着各种困难和风险。Powell-Abel 等（1986）认为如果通过一个病毒基因的表达而使植物得到保护，则这些问题有可能被克服。他们使用重组 DNA 技术证明了表达 TMV 外壳蛋白基因的转基因烟草植株，在接种后未受到侵染或显著地延迟了系统性发病。这些转基因植株在细胞核中表达了 TMV 外壳蛋白的 mRNA。在用 TMV 接种后，来自自花受精的转化植株（transformed plant）的幼（籽）苗症状出现了延迟。因此，一种控制病毒病的新途径就这样出现了。自这些实验之后，该现象已经被证实是广泛存在的，而且已经发现了两种基本保护类型：基于基因产物（gene product）表达的保护和基于 RNA 的保护。这两类保护类型正使数种作物能够抵抗一些特定的病毒，达到了经济上有用的保护，但是有关这一途径的可接受性出现了各种非科学的和伦理方面的问题。

20 世纪 80 年代后期和 20 世纪 90 年代是分子生物学技术应用于植物病毒学的多个方面的时期。除上述那些领域外，反向遗传学（reverse genetics）正被用于阐明病毒基因以及控制序列的功能。该技术手段与其他的手段如鉴定互作分子的酵母系统、转化植物以表达病毒基因与标记病毒的基因组以便了解它们在细胞里发挥功能的部位的能力一起正在揭示病毒及其寄主之间互作的复杂性。

植物基因组序列测定与分析的进展有助于鉴定植物的抗病毒基因。

在 20 世纪 90 年代后期用病毒的序列转化植物的工作的主要进展是认识到植物拥有一个对抗“外源”核酸的普通防卫系统（defense system）。与此密切相关的是能够抑制该防卫系统的病毒基因的鉴定。

近年来，在建立一个稳定的、国际上承认的病毒的分类和命名系统方面已取得相当大的进展。977 种植物病毒已被归类于 14 个科和 70 个属之内。14 个病毒科和大多数（但非所有的）属均有显著差异。它们具有的一系列物理与生物学性质使新分离的病毒可被相当容易地归类于某一个科或属。侵染植物、无脊椎动物、脊椎动物和微生物的病

毒的核苷酸序列数据的迅速增加，比过去更加强烈地强调了病毒学的实质统一性。因此，对病毒学者而言，考虑建立更高的分类单位的时机已经成熟。

我们对植物病毒作用方式的理解以及如何将相关知识用于病毒控制方面的研究进展，已经导致该学科出版物的大量涌现。在题目、摘要与关键词中带有"virus + mosaic"（病毒+花叶病）和"virus + mottle"（病毒+斑驳）的出版物的数目见图 1.3。显然这一个调查并不包括所有的植物病毒文献，因为在病毒名称中带有 streak（细条）或 stripe（条纹）等词的论文就不包括在内（图 1.3）。

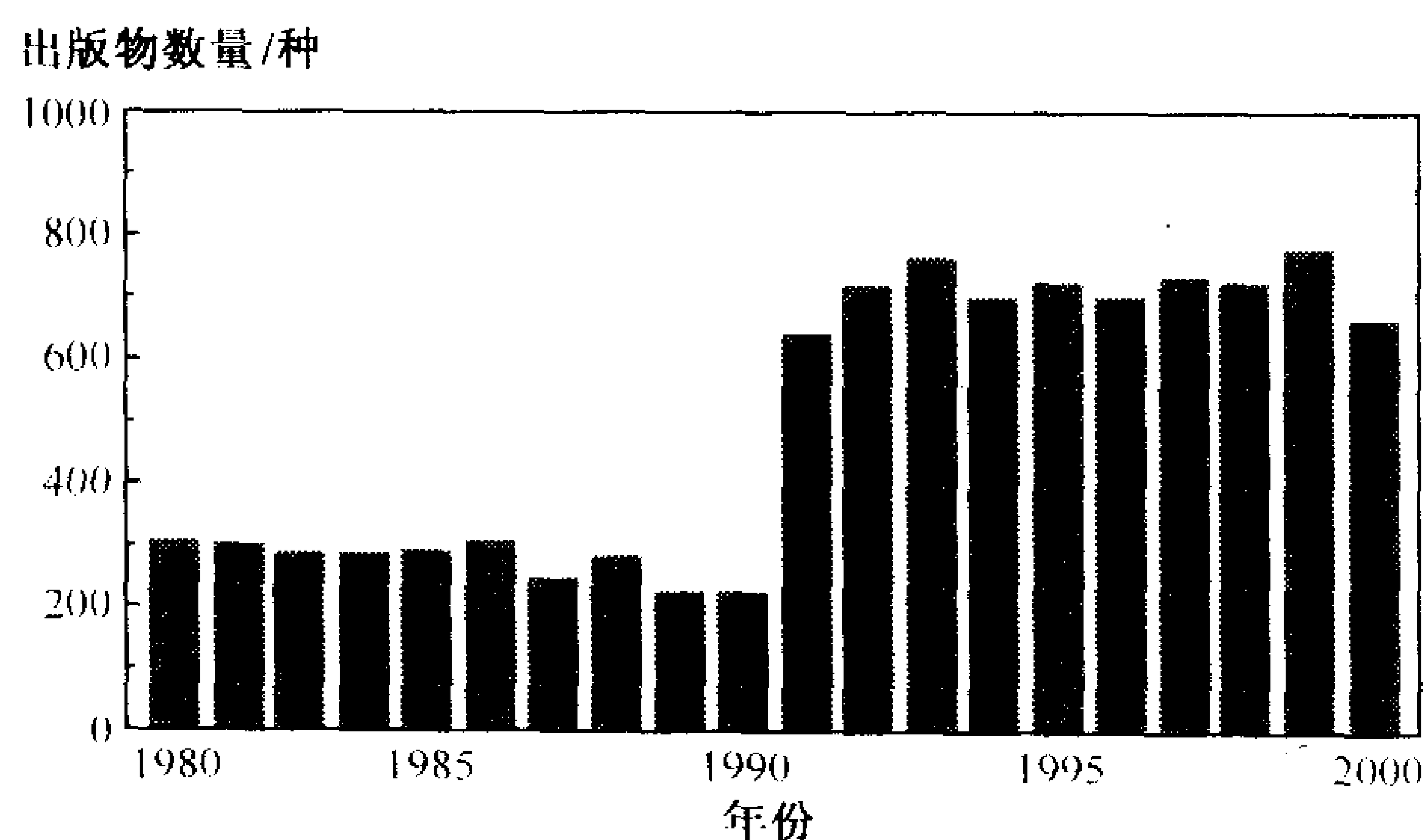


图 1.3　1980～2000 年发表的带有"mottle + virus"和"mosaic + virus"主题词的出版物

尽管我们对病毒基因组的结构、功能和复制已有较多理解，但仍然有很多不清楚的地方。我们对侵染病毒（infecting virus）如何引起寄主植物发病的分子机制尚不了解。几乎可以肯定，侵染过程包括病毒的大分子（蛋白质和核酸）与寄主大分子结构（macromolecular structure）之间高度专化性的互作（specific interaction）。目前，我们似乎缺乏适当的技术去取得更大的进展。也许对病害过程（disease process）的理解会成为在 21 世纪初叶前 10 年病毒学中令人激动的领域。有关植物病毒学的历史发展的更多细节见于 Zaitlin 和 Palukaitis（2000）的文章，以及 Scholthof 等（1999）关于 TMV 研究历史与现状的文集，这些著作推动了许多观念上的进展。Hull 等（1989）出版了一部与病毒学相关的病毒和术语的词典。

第Ⅱ节　病毒的定义

就其核酸的大小而言，病毒小至一个单顺反子的（monocistronic）mRNA（如烟草坏死病毒的卫星病毒，STNV），大至一个大于最小细胞的基因组（图 1.4）。在尝试定义病毒是什么之前，我们必须考虑它们如何一方面不同于细胞型寄生物，另一方面亦不同于可转座的（transposable）的遗传因子。三类最简单的寄生性细胞（parasitic cell）为：支原体（mycoplasma）、立克次氏体（*Rickettsiae*）与衣原体（*Chlamydiae*）。

支原体类以及相关的生物在光学显微镜下是观察不到的。其细胞具有双层膜，直径为 150～300 nm，但是没有细胞壁。它们包含有核糖体和 DNA，以二分裂（binary fission）

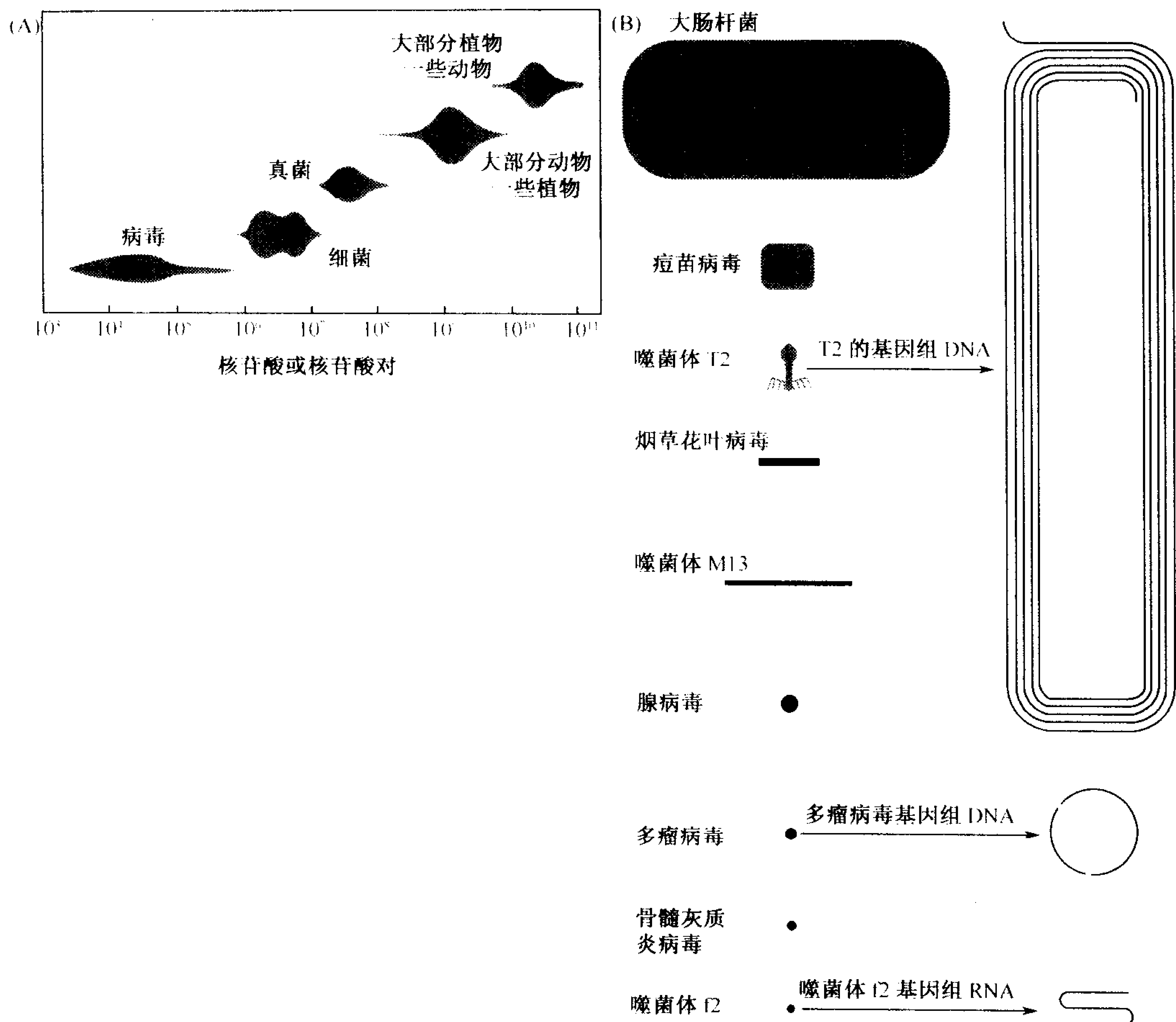


图 1.4 不同生物的大小比较。(A) 按照基因组大小归类的各种生物，纵轴为每组的基因组大小范围内种（或病毒）的相对数目的大致比例。根据 Hinegardner (1976) 重绘。(B) 一种细菌与几种病毒之间的大小比较。承蒙版权所有者（© Springer-Verlag）惠允，引自 Diener (1999)。

方式复制；那些侵染脊椎动物的可在体外生长，它们的生长受到某些抗生素的抑制。

立克次氏体，如斑疹伤寒（typhus fever）的病原，很小，为不能游动的细菌，直径约为 300 nm。它们有细胞壁、质膜、含核糖体的细胞质和 DNA 链。它们是专性寄生物（obligate parasite）并且曾被认为与病毒相关，但它们肯定是细胞，因为它们以二分裂方式繁殖，而且包含生产 ATP 的酶。

衣原体，如引起鹦鹉热（psittacosis）的病原因子，包括已知最简单类型的细胞。它们是专性寄生物并且缺乏产生能量的系统，其生活周期包括两个时期。在寄主细胞的外面，它们以大约直径为 300 nm、有传染性的原体（elementary body）形式存在。这些原体有密集的内容物，没有细胞壁，而且为细胞外的生存而特化。原体通过吞噬作用（phagocytosis）进入寄主细胞。在 8 h 内，它转变成一个更大的、无侵染性的网状体（reticulate body），被来源于寄主的双层膜包裹着。网状体通过二分裂方式在这个膜里分裂，在 40～60 h 内产生数以千计的后代。网状体转变为原体，当寄主细胞溶解时释

放出来。

有些标准不能将所有的细胞与所有的病毒区别开。这些标准包括：

（1）大小：一些痘病毒（pox virus）比衣原体的原体更大。

（2）基因组的性质和大小：许多病毒有像细胞一样的双链 DNA，并且一些病毒的 DNA 比衣原体中的 DNA 大。

（3）DNA 和 RNA 的存在。

（4）病毒和支原体都没有坚硬的细胞包膜。

（5）在活的寄主细胞外面，病毒与许多类群的专性细胞性寄生物（cellular parasite）如衣原体都不能生长。

（6）病毒和衣原体中没有产生能量的系统。

（7）病毒和某些细菌所需的氨基酸等完全依赖于寄主细胞。

有 3 个相关的标准看来能够将所有的病毒与所有的细胞区别开来：

（1）在细胞内复制期间没有一个连续的膜将病毒与其寄主分开。在寄主细胞内复制的细胞性寄生物总是以一个连续的双层膜（continuous bilayer membrane）与寄主细胞的细胞质分开（图 11.24）。

（2）病毒中缺少蛋白质合成的系统。

（3）病毒的复制是通过先合成许多组分，随后从组分库中装配出许多病毒粒体（virion 或 virus particle）。即使最简单的细胞亦通过二分裂方式进行复制。

质粒（plasmid）是在许多类型细菌中于染色体外（extrachromosomal）存在的、能够进行自主复制的遗传因子。它们由闭合环状的 DNA 所组成。一些质粒能够整合进寄主染色体之内，而且随着染色体被动复制。侵染原核生物（prokaryote）的一些病毒有类似质粒的性质，尤其是能够整合进入寄主细胞的染色体之内。然而，病毒在下列方面不同于质粒：

（1）正常的病毒具有粒子形态，其结构是为在细胞外的环境中保护遗传物质而设计的，并且能够促进病毒进入新的寄主细胞。

（2）病毒基因组为特定的病毒功能而高度地组织化，对寄主细胞没有已知的价值，然而质粒的遗传物质通常对其寄主细胞的生存是有用的。

（3）病毒能引起寄主生物的病害或细胞的死亡，但是质粒不会。

我们可以将病毒定义如下：

病毒是一套（一个或一个以上）核酸模板分子，通常包裹在由蛋白质或脂蛋白组成的一个（或一个以上）保护性的衣壳中，只能在适当的寄主细胞里面组织其自身的复制。

在这样的细胞里，病毒复制：①依赖于寄主的蛋白质合成机制（protein-synthesizing machinery）；②从所需材料的库中加以组织而非通过二分裂；③位于某些位点，不会被脂蛋白双层膜与寄主细胞内容物分开；④通过病毒核酸的各种变化不断地产生变体（variant）。

某个因子若要肯定地被鉴定为病毒，一般必须证明其能被传播并且可引起至少一种寄主的病害。然而，隐潜病毒组（*Cryptovirus*）的植物病毒例外。这一组群的病毒很少引起可见的病害，并且除了种子或花粉之外不能经由任何其他的机制传播。

病毒的结构和复制有下列各项特征：

（1）核酸可能是DNA或RNA，单链或双链。

如果核酸为单链，它可能是正（义）链，亦可能是负（义）链（正义序列可以作为mRNA用于翻译，产生病毒编码的蛋白质）。

（2）成熟的病毒粒体可能包含基因组核酸之外的多聚核苷酸（polynucleotide）。

（3）若遗传物质由一个以上的核酸分子所组成，每个分子可能被分别包裹在一个单独的粒体中或全部核酸分子都位于一个粒体中。

（4）病毒基因组的大小差异很大，可编码1～250个蛋白质。

植物病毒的基因组位于这一范围的低端，编码1～12个蛋白质分子。病毒编码的蛋白质可能在病毒复制、病毒在细胞间的移动、病毒结构以及在被无脊椎动物或真菌的传播中发挥功能。

（5）病毒发生遗传变化。在基因组复制期间复制过程的错误引起的核苷酸变化导致点突变以相当高的频率发生。

其他类型的遗传变化可能是由于重组（recombination）、基因组片段的重配（reassortment）、遗传物质的损失以及获得了不相关病毒或寄主基因组的核苷酸序列。

（6）病毒基因组编码的酶亦可能存在于病毒粒体。这些酶的大多数与核酸合成有关。

（7）许多病毒的复制在细胞内由病毒诱导产生的特殊区域即病毒质（viroplasm）中发生。

（8）一些病毒与某些非病毒的核酸分子具有整合进寄主细胞基因组的共同特性，可从一个整合位点（integration site）转位到另一个位点。

（9）少数几种病毒为进行复制需要其他病毒的存在。

第Ⅲ节　关于本版本

本版本保留着先前版本的许多特征，但是已经重新加以组织以补充病毒功能方面的新知识。前几章描述病毒的基本特征和分类、它们引起的症状、提纯的方式、组成成分以及粒体的结构。随后的两章将讲述病毒如何表达其遗传信息以及如何进行自我复制。接下来的数章将讨论在病害传播与症状表现过程中病毒-寄主植物-传播介体间的互作，在其中一章中集中介绍这些功能是如何整合的以及如何将其中的一些功能利用于其他方面。最后的几章讲述其他类似病毒的（virus-like）序列以及植物病毒的检测（detection）、控制和进化。希望这将会形成一个合乎逻辑的顺序，并揭示出本学科的广博与动态性（dynamism）。

在这样一个动态性的学科中，自前一版出版的10年来，又新发表了浩如烟海的相关论文（图1.3）。在许多场合下，作者建议读者参阅特定主题的综述性文章，因为在综述中可找到有关该主题的原始论文。本版本保留了先前版本中许多较老的参考文献，因为这些文献描述的现象和结果有助于解释正待阐明的新现象。较老的参考文献也可作为植物病毒学的一个远景（perspective），因为本学科有可能会被新的“风行”课题所淹没。

第2章　植物病毒的命名与分类

第Ⅰ节　命名

A. 历史背景

在研究自然物体时，人们会有将其命名和分类的内在欲望，植物病毒学家也不例外。病毒分类，像其他所有分类一样，就是将表现相似性质的对象分成若干组群。即使病毒分类是没有任何自然基础的、完全人为的活动，但它确实有某些特点：

- 它使这类生命体得到结构化的排列，以便人类更易于理解它们；
- 它有助于病毒学者之间的交流；
- 它可使新病毒的性质能够被推断、预知；
- 它能够揭示可能的进化关系。

在理论上，有可能将病毒命名和分类作为不同的议题分别考虑。然而，实际上，命名很快会涉及分类。

早期的研究人员赋予病毒的名称通常来自受病毒侵染并表现最显著病害症状的寄主植物名，如烟草花叶病毒。最初，人们认为病毒是稳定的实体（entity），并且一种寄主的各种症状表现是由不同的病毒导致的。然而，至19世纪30年代初期，人们开始认识到3个重要的事实：

（1）病毒有不同的株系，它们在相同的寄主植物上可引起非常不同的症状。

（2）不同的病毒可能在相同的寄主植物上引起非常相似的症状。

（3）一些病害可能由两种互不相关的病毒混合侵染所引起。

J. Johnson在1927年以及后来的文章中强调了在鉴定病毒时使用除病害症状和寄主植物之外的一些其他标准的必要性。他建议，在为一种病毒命名时，应该用首先发现该病毒的寄主的普通名，再加上“virus”（病毒）这个词和一个数字，如用烟草病毒1号（tobacco virus 1）代表TMV。Johnson和Hoggan（1935）基于下述5个性状编写了一个描述性的植物病毒索引：传播方式（mode of transmission）、自然寄主或鉴别寄主（natural or differential host）、体外存活期（longevity *in vitro*，LIV）、致死（钝化）温度（thermal death/inactivation point），以及独特的或特异性的症状。当时共鉴定了约50种病毒，并被归类于若干个组群中。

K. M. Smith（1937）制订了一个方案，将已知的病毒或病毒病分为51个组。按照某种病毒首次被发现时的寄主植物的属名进行命名和归类。给予每个组内的连续成员一个相应的数字。例如，TMV在当时被称为“*Nicotiana* virus 1”（烟草属病毒1号），在烟草属病毒组中有15种病毒。基本性质很不相关的病毒被放在了同一个组中。虽然Smith的清单曾一时被用作已知病毒的有用目录，但是不能将其视为正式的分类（classification）。

Holmes（1939）主要基于寄主反应（host reaction）和传播的方式建立（发表）了一个病毒分类方案。他采用了拉丁文的双名（binomial）/三名（trinomial）命名系统。例如，将 TMV 的学名写为 *Marmor tabaci*，Holmes（Marmor，拉丁文，意为大理石花纹）。Holmes 的分类是以病害而非病毒为基础，因此他将 89 种植物病毒中的 53 种归类于 *Marmor* 属中，该属包含了甚至在当时已知性质差异很大的一些病毒。

1940～1966 年，各种不同的分类方案陆续出台，有的只针对植物病毒，有的针对所有的病毒。这些方案中没有一个被病毒学者广泛采用。人们逐渐认识到，一个总体上可以接受的命名和分类系统只有在考虑现时大多数病毒学者的意见的基础上，通过国际合作和协商才可能建立起来。

在 1966 年于莫斯科举行的国际微生物学大会上，国际病毒命名委员会（International Committee for the Nomenclature of Viruses）召开了第一次会议，代表许多国家微生物学会的 43 人参加了这次会议。会上成立了一个为所有病毒建立国际公认的分类和命名法的组织，并建立了病毒的命名规则。后来该组织改称为国际病毒分类委员会（International Committee for Taxonomy of Viruses，ICTV）（Matthews，1983a；1985a，b）；ICTV 已经发表了 7 次分类报告*（Wildy，1971；Fenner，1976；Matthews，1979；1982；Francki *et al.*，1991；Murphy *et al.*，1995；van Regenmortel *et al.*，2000），在 *Archives of Virology* 期刊上还发表了一些中期报告。

用于植物病毒命名和分类的一些主要特征将在下面几节加以讨论。

B. 分类系统

生物（organism）可以用两种普通的方式进行分类。一是林奈（Linnaeus）应用于植物和动物的、经典的单线（monothetic）分类等级体系。这是一个对于不同性质的相对重要性做出决定的合乎逻辑的系统，用该系统可将一个分类群归于某个特定的门、纲、目、科、属等。Maurin 等（1984）提出了一种类似的分类系统，它包括侵染各类寄主的病毒。虽然这类系统便于建立与使用，然而就病毒而言它们没有坚实的基础。这类系统的主要问题是，我们没有为所有不同特征的相对重要性加以分级的科学基础。例如，核酸的类型（DNA 或 RNA）比脂蛋白包膜的存在与否更重要吗？在病毒复制期间，小 RNA 病毒的粒体对称性（螺旋状的杆或等面体外壳）比基因组策略的某个方面更重要吗？

Adanson（1763）提出了不同于等级系统的另一种分类法。他认为只有对所有可能的特征加以考虑才能做到最恰当的分类。他做了一系列不同的分类，每个分类均基于一个单独的特征，然后验证有多少这样的特征以同样方式用于分种。这是基于最大数目的相关特征做出的分类。该方法很繁琐，因为至少需要约 60 个同等权重的（equally weighted）独立质量特征才能得到满意的分类，所以以前没有得到多少应用（Sneath，1962；Harrison *et al.*，1971）（表 2.1）。虽然计算机的应用已经使人们对这种分类法重新产生了兴趣，但是迄今尚未大量应用。

---

* 现在 ICTV 已经发表了第 8 次分类报告——译者。

表 2.1　病毒分类学中应用的描述词

Ⅰ. 病毒粒体特征

A. 病毒粒体的形态学特征

1. 大小（size）
2. 形状（shape）
3. 包膜（envelope 或 peplomer）的有无
4. 壳粒的对称性（capsomeric symmetry）与结构

B. 病毒粒体的物理学特性

1. 分子质量（molecular mass）
2. 浮力密度（buoyant density）
3. 沉降系数（sedimentation coefficient）
4. pH 稳定性（pH stability）
5. 热稳定性（thermal stability）
6. 阳离子（Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ca^{2+}）稳定性（cation stability）
7. 溶剂稳定性（solvent stability）
8. 变性剂稳定性（detergent stability）
9. 放射稳定性（radiation stability）

C. 基因组的特性

1. 核酸的类型：DNA 或 RNA
2. 链的类型（strandedness）：单链或双链
3. 线状（linear）或环状（circular）
4. 极性：正义（positive）、负义（negative）或双义（ambisense）
5. 片段的数目
6. 基因组或基因组片段的大小
7. 5′端帽子的有无以及类型
8. 5′端病毒基因组共价连锁多肽的有无
9. 3′端 poly(A)或其他特异序列的有无
10. 核苷酸序列的比较

D. 蛋白质的特性

1. 数目
2. 大小
3. 功能活性（特别是病毒粒体内包含的转录酶、反转录酶、血凝素、神经氨酸酶以及融合蛋白）
4. 氨基酸序列比较

E. 脂类

1. 有无
2. 性质

F. 碳水化合物

1. 有无
2. 性质

Ⅱ. 基因组组构与复制

1. 基因组组构

续表

2. 核酸复制的策略
3. 转录特征
4. 翻译和翻译后加工的特征
5. 病毒粒体蛋白的积累位点、装配位点、成熟和释放位点
6. 细胞病理学，内含体的形成
Ⅲ. 抗原特征
1. 血清学关系
2. 抗原表位（决定簇）定位（mapping epitope）
Ⅳ. 生物学特性
1. 寄主范围（自然的和实验的）
2. 致病性，与病害的联系
3. 组织向性（tropism），病理学和组织病理学
4. 自然传播途径
5. 介体关系
6. 地理分布

经允许，引自 Fauquet（1999）。

在实践中，即使特征的权重只限于决定忽略或包括某种特征，也不可避免地要加以考虑。

目前它的主要优点可能在于证实以其他方式建立的归类，以及提出可能是确定无疑的、以后可以通过进一步实验工作验证的关系。

多种不同科、属病毒的核苷酸全序列数据的迅速积累正在以至少 5 种方式对病毒分类产生深远的影响。

（1）ICTV 以前主要基于形态学描述的多数病毒科，现在可以看出代表了具有相当接近的进化起源的病毒簇（cluster）。

（2）随着先前未怀疑的侵染不同寄主类别的病毒之间遗传相似性的发现，病毒学的统一性现在是相当明显的。一些植物病毒学者对将科、属和种应用于植物病毒采取拖延的态度难以为继。

（3）现在基因型数据在病毒分类的许多方面比表现型特征更为重要。

然而，分类时只使用基因型（序列）数据有一些限制因素。一个重要的因素是，就我们知识的现状而言，纯粹基于序列数据来推断一个病毒的表现型特性是非常困难，甚至不可能的。例如，如果有在某个位点单个核苷酸不同的两个病毒核苷酸序列，在大多数情况下，我们不能单独从该信息推论：在相同的寄主中，一个病毒核苷酸序列导致花叶病而另一个导致坏死 。然而，随着对基因功能的理解逐渐加深，现在我们可以只从核苷酸序列就能确定，两种弹状病毒（rhabdoviruses）中的哪一种在植物和昆虫体内复制、哪一种在脊椎动物和昆虫体内复制。

病毒的任何分类系统不仅应该基于进化史（从基因型即可确定），而且也应该是实用的。在病毒分类中今天使用的大部分表现型特性将会继续保持其重要性，即使当多数

病毒基因组的核苷酸序列被确定后也是如此。

C. 科、属、种与组

1970 年在墨西哥召开的一个会议上，ICTV（当时称为 ICNV）批准了病毒的第一批分类单位（Matthews，1983a）。它们包括两个科和每个科内的典型属，此外还有 22 个不归科的属，包括侵染脊椎动物、无脊椎动物或细菌的病毒。与此同时还批准了 16 个称为“组”的分类单位，用于侵染植物的病毒。后来当其他方面的病毒学者相当快地为病毒建立科（family）、属（genus）系统时，植物病毒学者却一直坚持“组”（group）的观念。一些植物病毒学者难以接受种（species）的概念，认为它不应该用于病毒。他们的主要理由是，病毒通过无性繁殖方式增殖，因而不能采用生殖隔离（reproductive isolation）的标准作为定义病毒种的基础（Milne，1988）。

生物学分类中主要的基本单位是种。Davis 和 Heywood（1963）在讨论被子植物（angiosperm）分类法方面务实的观点是：

对于种没有通用的正确定义，只有在我们将精力集中于为了任何目的而看作种的问题时，才会在关于种的问题上取得进步。

Wagner（1984）也讨论了应用于植物的种的概念。在实际工作中，病毒学者使用“病毒”的概念时是指一群密切相关的株系（strain）、变株（variant）或致病变种（pathovar）。这样定义的病毒本质上是 Davis 和 Heywood 提议，并且由 ICTV 定义的一个种。在 1991 年，ICTV 接受了病毒种的概念，并采用了下述定义（van Regenmortel，1990）：

一个病毒种是组成一个复制谱系（replicating lineage）、占据一个特定生态位（ecological niche）的多特性（polythetic）病毒群体。

在随后发表的 ICTV 报告中，种已经形成现代病毒分类的基础；尤其在第 7 次报告中，每个属都有“分种标准”（species-demarcating criteria）。这使得病毒能够被区分为种和暂定种（tentative species）。van Regenmortel 等（1997）发表了关于病毒分种的指导方针。

随着种成为分类系统的基础，在各种不同的标准下，若干个种可归类成为其他更高的分类单位。迄今 ICTV 已定义了目（order）、科和属等分类单位（表 2.2），将来可能还会有增加更高的和中间的分类单位的要求。例如，Hull（1999b）认为，为了对通过反转录复制的病毒以及转座子进行综合性分类，应当建立纲（class）和亚目（sub-order）等分类单位。

Fauquet（1999）与 van Regenmortel 等（2000）对病毒分类、当前接受的分类单位以及 ICTV 如何运作等进行了详细讨论。

1. 病毒（种）的界定

对自然界中存在的病毒种类，即病毒种的界定（delineation）是实际的需要，尤其是为了控制病毒病而进行的病毒诊断。

表 2.2　不同病毒分类单位的划分标准

1. 目
几个科之间的共同特性包括：
生物化学组成
病毒复制策略
粒体结构
总的基因组组构
2. 科
几个属之间的共同特性包括：
生物化学组成
病毒复制策略
粒体结构的性质
基因组组构
3. 属
属的共同特性包括：
病毒复制策略
基因组大小、结构和（或）片段数目
序列同源性（杂交特性）
介体传播
4. 种
种内的共同特性包括：
基因组重排（rearrangement）
序列同源性（杂交特性）
血清学关系
介体传播
寄主范围
致病性
组织向性
地理分布

经允许，引自 Fauquet（1999）。

近 20 年来，B. D. Harrison 和 A. F. Murant 作为应用生物学家协会（Association of Applied Biologists，AAB）的编者，出版了一系列共 339 辑有关植物病毒、植物病毒组和科的描述（植物病毒志）。每辑描述均由研究该病毒或该病毒组（属）的权威专家撰写。两位编者用他们自己设计的得到公认的指导方针决定一个在该文献中描述的病毒是一种新的病毒或只是以前已描述过的病毒的一个株系。当他们发表新的病毒描述时，他们实际上是在界定病毒的一个新种。AAB 植物病毒志（Descriptions of Plant Viruses）被植物病毒学者广泛使用并且被视作实用而有效的分类学文献。该植物病毒志现在包括大多数已知的植物病毒，并且经更新后已被 AAB 制作成只读光盘（CD-ROM）（附录 3）。

人们现在承认一些病毒为“种”或“暂定种”（tentative species）；暂定种是指某些

病毒尚未得到充分鉴定，不能确定它们是新种还是一个已存在的病毒的株系，或者尚未充分了解这些病毒所在属的特性。在 ICTV 第 7 次报告中列出了 977 种植物病毒，其中 701 个是真正的种，276 个为暂定种。

2. 病毒株系和分离物

一个普遍的问题是要确定一个新的病毒是真正的新种还是已存在种的一个株系（strain）。相反，以前被认为是一个株系的病毒经过进一步研究可能成为一个明确的种（distinct species）。这是由于复制中连续产生错误而形成的病毒群体结构，可以认为是一个准种（quasispecies）集。准种的概念将在第 17 章第 Ⅰ 节 A 部分更详细地讨论。

在命名一个株系时还应考虑各种不同的特征。在第 17 章病毒变异和进化部分将对此做更详细的描述。

3. 病毒（种）的命名

有关病毒命名法的问题在数年来已经比如何界定明确的病毒种这样实际上更加重要的问题引发了更多的热烈讨论。在现代病毒分类法建立的早期阶段，Gibbs 等提议将编码程式（cryptogram）与病毒的（普通）俗名（vernacular name）一起使用，以使病毒名称更加准确（Gibbs *et al.*，1966）。该提议并未得到广泛应用，只有一些植物病毒学者曾经使用过一段时间。

当 ICTV 批准一个科或属时，还将同时指定一个模式（典型）种（type species）或模式病毒（type virus）。一些病毒学者赞成用病毒的英文俗名作为正式的种名。使用大家熟悉的俗名作为正式种名时常可能是非常适当的解决方法，但是它并非总是适用的（如对于刚发现的病毒）。其他病毒学者赞成为病毒（种）进行系列编码（serial numbering）。其他（非病毒学）领域的微生物学家的经验是，虽然数字或字母编码系统最初易于建立，但是随着时间的推移，当必须对分类组群做出改变时，将会导致混乱。ICTV 曾长期支持拉丁化双名法用于病毒的提议，但是从未将其用于任何病毒。有关拉丁化的提议现在已经被撤回。

在随后 ICTV 连续数版的报告（Matthews，1982）中，索引部分列出的病毒名称是由俗名（通常为英文）加科名或属名组成，如 tobacco mosaic *Tobamovirus*（烟草花叶病毒）、Fiji disease *Fijivirus*（斐济病毒）和 lettuce necrotic yellows *Rhabdovirus*（莴苣坏死黄化弹状病毒）。此后，这一命名植物病毒的方式日益广泛地应用于文献中。

4. 首字母词或缩写

病毒名称的缩写已经被应用多年，使文献更易读、行文更简洁。缩写通常以首字母词（acronym）的形式出现，即使用病毒名称每个词的首字母。由于首字母词的写法是由论文作者确定，因此导致产生很多重叠和混乱。例如，AMV 曾用于代表 alfalfa mosaic virus（苜蓿花叶病病毒）和 arabis mosaic virus（南芥菜花叶病毒），而且也可以代表 abutilon mosaic virus（苘麻花叶病毒）、agropyron mosaic virus（冰草花叶病毒）、alpinia mosaic virus（山姜花叶病毒）、alstromeria mosaic virus（六出花花叶病毒）、alternanthera mosaic virus（莲子草花叶病毒）、aneilema mosaic virus（安尼来墨草花叶

病毒）或 anthoxanthum mosaic virus（黄花茅花叶病毒）。因此，1991 年 ICTV 的植物病毒分会开始采取植物病毒首字母词的合理化措施（Hull *et al.*，1991），而且随后已经定期更新病毒名录（Fauquet and Martelli，1995；Fauquet and Mayo，1999）。缩写的方式基于下列原则：

- 缩写应该尽可能简单；
- 不能与先前确立并且现在仍然使用的任何其他缩写重复；
- 名称中的词“virus”缩写为“V”；
- 名称中的词“viroid”（类病毒）缩写为“Vd”。

Fauquet 和 Mayo（1999）建立了一套病毒分类相关的指导方针。虽然这些首字母词尚未得到 ICTV 的正式承认，但已被用于第 7 次分类报告（van Regenmortel *et al.*，2000），希望植物病毒学界将来使用它们。这些指导方针如下：

（1）除非遇到指导方针第 7 条和（或）第 8 条适用的情况，当相似的病毒名称包含术语“花叶”（mosaic）和“斑驳”（mottle）时，选择“M”代表“花叶病”，“Mo”代表“斑驳”。例如，豇豆花叶病病毒（*Cowpea mosaic virus*）和豇豆斑驳病毒（*Cowpea mottle virus*）分别缩写如 CPMV 和 CPMoV。然而，目前仍然存在着少数缩写，其中“Mo”并非代表“斑驳”，因为以前没必要这样做。除非以后必须改变，否则这些用法将继续保持现状。

（2）“ringspot”（环斑）这个词在多数（但非所有）情况下被缩写为“RS”，虽然只用“R”就应该足够了。

（3）“symptomless”（无症）这个词在多数，但非所有情况下被缩写为“SL”，虽然只用“S”就应该足够了。

（4）寄主植物名称的第二或第三个字母，或有时第二个辅音或最后一个字母，用小写，可以用来区别某些易于发生冲突的缩写，如 CdMV 代表 *Cardamum mosaic virus*（豆蔻花叶病毒）。

（5）应该避免使用相同的字母、只靠大小写区别的缩写。

（6）单个词的缩写一般不应超过 2 个字母。

（7）当缩写词的长度将会超过 5 字母时，应省略次级字母以避免缩写词过长。例如，人们更愿意用 CGMMV 而非 CGMoMV，即使后者符合指导方针第（1）条 。

（8）除非其使用可能引起混乱，一般应尽量保留现在广泛使用的缩写。然而，缩写可以，而且已经在普通用法方面发生改变。本建议（指导方针）的目的是为缩写的和谐提出目标。一般认为，一些缩写今后不太可能会改变。

（9）当某一个字母组合已经用于一个特别的植物种时，包含相同寄主的病毒名称的新缩写一般会使用相同的字母组合。

（10）当几个病毒有相同的名称并且只由一个数字相区别时，缩写应在字母和数字之间加一个连字符，例如，*Plantain virus* 6（车前草病毒 6 号）和 *Plantain virus* 8（车前草病毒 8 号）分别被缩写为“PlV-6”和“PlV-8”。

（11）当病毒由一个字母相区别时，这一字母直接写在缩写的后面，不加连字符，例如，*Plantain virus* X（车前草 X 病毒）缩写为 PlVX，这与植物病毒学普通用法的多数情况一致（如 PVY、PVX、PVM 和 PVS 等）。

（12）当病毒由其地理起源或任何其他的字母组合相区别时，应将最少的（2 或 3 个）字母加到病毒缩写后，并在两套字母之间加一个连字符。例如，分离自泰国的 *Tomato yellow leafcurl virus*（番茄黄曲叶病毒）缩写为“TYLCV-Th”（国家与地区名字的缩写见附录 1）。

（13）当病毒名称包含病害名和“associated virus”（伴随病毒）时，缩写为“aV”。例如，*Grapevine leafroll-associated virus* 2（葡萄卷叶伴随病毒 2 号）缩写为“GLRaV-2”。

（14）在某些情况下，一个植物名被缩写成两个大写字母，这种用法被作为例外保留下来，如“CPRMV”为 *Cowpea rugose mosaic virus*（豇豆皱缩花叶病毒）的缩写。

当前使用的缩写或首字母词的名单见附录 1。

D. 植物病毒的科、属和目

植物病毒的分类现状见附录 2，分类图示见图 2.1。

病毒属没有正式的定义，但是它通常被认为是“具有共同特性的病毒种的群体，而且不同于其他种的群体”。界定一个属的标准见表 2.2。现在已正式承认 70 个植物病毒属。在某些情况下，如弹状病毒科（*Rhabdoviridae*），有许多病毒明显地属于该科，但还没有足够的信息将其划归到现有的属中，或为其创造新属；这些病毒被列为“未归类的”（unassigned）的病毒。有的属根据模式种命名，例如，*Caulimovirus*（花椰菜花叶病毒属）是由花椰菜花叶病毒而得名，有的属具有描述性的名称，即根据属的一个主要特征通常选取来自希腊文或拉丁文的词，例如，*Closterovirus*（长线病毒属）来自希腊文的 κλωστηρ（kloster），意为纺锤体或线，描述了病毒的粒体形态；*Geminivirus* 来自拉丁文 *geminus*，意即孪生（twins），也表明了该组群病毒的粒子形态。

同样地，将数个具有共同特性的属归于一个科（表 2.2）。目前有 14 个植物病毒科（附录 2）。有些科，如呼肠病毒科（*Reoviridae*）和弹状病毒科（*Rhabdoviridae* ）与动物病毒科相同。22 个属尚未被归科，因而被称为“悬浮属”（floating genera）。获得有关这些“悬浮属”的更多数据，以及改变对于病毒分类的态度，无疑将会导致更多植物病毒科的建立。有些科是根据典型成员属命名的，如 *Caulimoviridae*（花椰菜花叶病毒科）由 *Caulimovirus* 而来；有些科名像属名一样是描述性的名，为该科的一个主要特征，如 *Geminiviridae* 表明了病毒粒体的形态特征。

迄今只有 3 个目被 ICTV 所接受。其中 *Mononegavirales*（单分子负链 RNA 病毒目）包含 *Rhabdoviridae*（弹状病毒科）等科，而 *Rhabdoviridae* 含有两个植物病毒属。

E. 病毒名称的使用

ICTV 在病毒命名法和分类学名称的规范方面设定规则，而这些规则是经常变更的（Pringle，1998；van Regenmortel *et al.*，2000）。种名的最后一个词是“virus”，属名的后缀（结尾）是“... virus”，亚科名的后缀是“... virinae”，科名的后缀是“... viridae”，而目名的后缀是“... virales”。在正式的分类学用法方面，病毒目、科、亚科、属和种名用斜体字（或下划线）印刷或书写，并且第一个字母需用大写；种名的其他词不用大写字母，除非它们是专有名词或专有名词的一部分。此外，在正式的使用

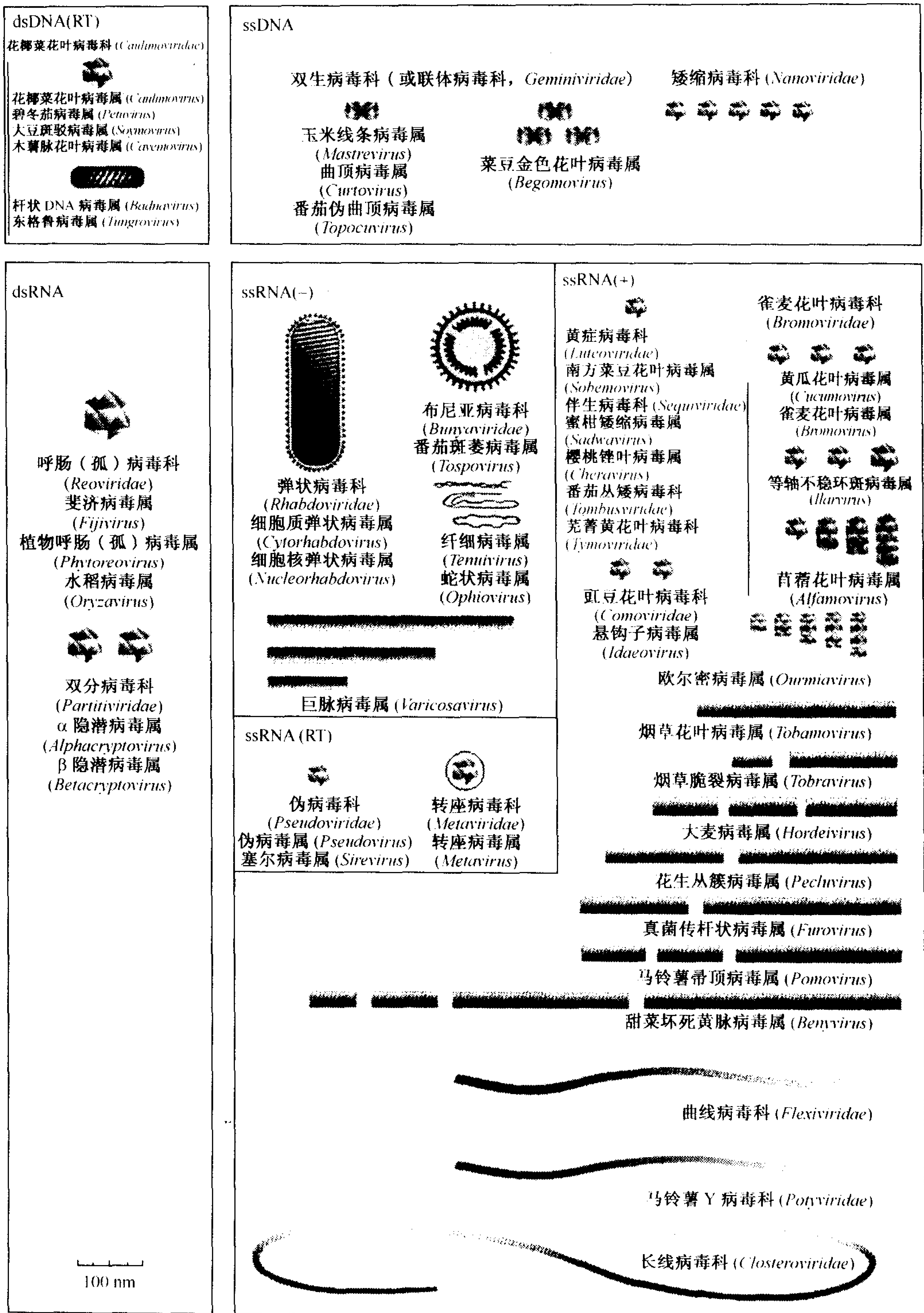


图 2.1 植物病毒的科与属*。各科、属病毒粒体的轮廓图基本符合比例。经允许，引自 Fauquet 等（2005)。

* 原著引用的图为 van Regenmortel 等（2000)，本中文版引用最新资料 Fauquet 等（2005）——译者。

中，分类单位名（科、属或种）应该放在病毒名称之前，如“the family（科）*Caulimoviridae*”，“the genus（属）*Mastrevirus*”和“the species（种）*Potato virus* Y（马铃薯Y病毒）”。在非正式使用时，科、亚科、属和种名用小写正体书写，分类单位（taxon）不包括正式的后缀，而且分类学的单位名称置于病毒名后面，如“caulimovirus family”、“mastrevirus genus”和“potato virus Y species”。在更不正式（但是广泛使用）的情况下，分类单位名称可省略，并且级别更高的分类单位可以用复数，如“caulimoviruses”、“mastreviruses”、“potato virus Y”等。

非正式的用法源自实际使用，随后可能被采用作为更正式的用法。例如，杆状DNA病毒属（*Badnavirus*）在1991年尚未被ICTV批准采用，但是在文献中已被广泛使用，因而在1995年的ICTV报告中终于被采用。然而，2000年的ICTV报告限定了杆状DNA病毒属（*Badnavirus*）的范围，只包括除RTBV以外的其他具有杆菌状（bacilliform）粒体的DNA病毒。显而易见，在本书中有必要对具有等轴（isometric）（球状）粒体与具有杆菌状粒体的反转录DNA病毒加以区别；非正式的用法是用“caulimoviruses”代表前者，而“badnaviruses”代表后者。

第Ⅱ节　病毒分类的标准

试图对病毒分类时涉及两个互相关联的问题。第一个问题是，相关的病毒必须置于属和较高的分类单位之内。为此，病毒的较稳定的性质，如核酸的数量和类型、粒体形态（particle morphology）和基因组策略（genome strategy）是非常有用的。第二个问题是，能够区别相关的病毒，而且对在一个组内成员间相互关系的程度做出某些评估。病毒的某些具有许多突变型的特性对这一个目的更加有用。这些特性包括症状（symptom）、寄主范围（host range）和外壳蛋白的氨基酸组成。某些性质，如血清学特异性（serological specificity）和氨基酸序列对划定组群（group）以及区别组群内的病毒可能是有用的。

当考虑用于病毒分类的标准时，必须记住两个普通的问题。一个是权重（weighting）的问题，即一个特征与另一个特征比较时的相对重要性。无论应用什么系统用来将病毒分类，特征的权重是不可避免的。第二个问题涉及一个特征的差异取决于另一个特征差异的程度。例如，核酸中单一碱基变化可能会导致外壳蛋白中一个氨基酸的替换（replacement），继而又会改变血清学特异性和病毒的电泳迁移率（electrophoretic mobility）。一个密码子中另一位置的相同碱基变化可能根本不会影响基因产物。

上述讨论与表现型特征有关。随着越来越多的病毒核苷酸全序列的测定，病毒的基因型正在变得日益重要。那么在病毒分类中序列数据应占多大的权重呢？一个遗传学者可能认为，一种病毒的进化史及其与其他病毒的关系完全取决于其核苷酸序列。在理论上讲这肯定是真实的，但是像在本章第Ⅰ节B部分讨论的一样，也要考虑一些实际的方面。

表2.1列出了用于病毒分类的全部特性。对鉴定一个病毒的若干株系有用的特性将在第17章第Ⅱ节中讨论。

A. 病毒粒体的结构

病毒结构在病毒分类中的重要性总结于图2.1。对于等径（isometric）（球状）的

病毒，电子显微镜所揭示的粒体形态不如棒（杆）状粒体的形态一样有用。这主要是因为许多等轴粒体具有相似的大小（直径为 25～30 nm），而且外表相似，除非获得高质量的制剂和照片（Hatta and Francki，1984）。如果经 X 射线分析或高分辨率电子显微镜检查已获得亚基的对称性与排列的细节，这些性质将为等轴病毒的归类奠定基础。对于具有复杂形态的大型病毒，电子显微镜镜检所揭示的粒体结构将带来表明可能关系的、有价值的数据。

B. 病毒粒体的理化特性

在分类中应考虑病毒粒体的理化特性和稳定性等因素。这些特性将在第 15 章第Ⅲ节讨论。没有侵染性的病毒蛋白质空壳和次要的非侵染性的核蛋白对某些组群是特征性的（如芜菁黄花叶病毒属病毒）。这些组分的存在反映了没有全长的病毒 RNA 时蛋白质外壳的稳定性。

C. 病毒核酸的性质

病毒基因组的结构和策略，如第 6 章所述，现在对于将病毒归入科与属，或者建立新的科或属是最重要的依据。黄症病毒（luteoviruses）就是一个好例子（Mayo and D′Arcy，1999）。在 ICTV 第二次报告中，它们首次被正式地承认为一个组，包括 BYDV、BWYV 和 SbDV 的 RPV、RMV 和 SGV 株系（Fenner，1976）。在其后数年，依据所用的标准，这些病毒的分组以不同的方式增加了。至第 6 次报告（Murphy *et al.*，1995）时，早先的“luteovirus group（组）”被命名为“黄症病毒属”（*Luteovirus*），而其中的种分为以 BYDV-PAV 和 PLRV 为代表的两个亚组（subgroup）。此时，多种黄症病毒基因组的序列已被测定，并且日益变得非常明显的是，需要对这一个组的分类重新加以考虑（D′Arcy and Mayo，1997）。不仅基因组组构存在差异，而且不同的病毒种具有不同的聚合酶：一些病毒有“香石竹斑驳病毒属类型”（carmovirus-type）的聚合酶，而其他病毒有“南方菜豆花叶病毒属类型”（sobemovirus-type）的聚合酶（参见第 8 章第Ⅳ节有关聚合酶的部分）。主要基于这些序列数据，黄症病毒组被划分为包含于黄症病毒科（*Luteoviridae*）内的 3 个属（参见第Ⅲ节 P 部分）（Mayo and D′Arcy，1999；van Regenmortel *et al.*，2000）。

另一个例子是花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）内各个属的界定。以前该科包括两个属：花椰菜花叶病毒属（*Caulimovirus*）和杆状 DNA 病毒属（*Badnavirus*）。然而，由于基因组组构的不同，现在依据其基因组组构与涉及反转录的复制的相似性，已经将其分别归于 *Caulimoviridae* 的不同属中（附录 2）（van Regenmortel *et al.*，2000）。原来的花椰菜花叶病毒属现在变成了 4 个属（*Caulimovirus*、*Soymovirus*、*Cavemovirus* 和 *Petuvirus*），而杆状 DNA 病毒属分成了两个属（*Badnavirus* 和 *Tungrovirus*）（Murphy *et al.*，1995）。

D. 病毒的蛋白质

病毒蛋白质的性质，尤其是氨基酸序列，在所有级别的病毒分类中都是很重要的，如第 17 章第Ⅱ节 B 所述的株系界定、该节所讨论的病毒种的归类以及明确病毒科和组

之间的进化关系等。

外壳蛋白氨基酸序列同源性已经用来区别不同的马铃薯Y病毒属病毒（potyviruses）及其株系（图2.2），以及估计组内成员相关性的程度（图2.3）。表明一个病毒组内关系的系统树（dendrogram）也以外壳蛋白的氨基酸组成为基础，如烟草花叶病毒属病毒（tobamoviruses）的系统树（Gibbs，1986）。基于体外翻译获得8种烟草花叶病毒属病毒的126 kDa蛋白质的肽型（peptide pattern）的系统树与以外壳蛋白获得的系统树非常相似（Fraile and García-Arenal，1990）。一旦一组病毒如烟草花叶病毒属病毒已经基于外壳蛋白的氨基酸组成被界定，新的分离物有时可能会相当容易地被确定为已存在病毒的一个株系（Creaser *et al.*，1987）。

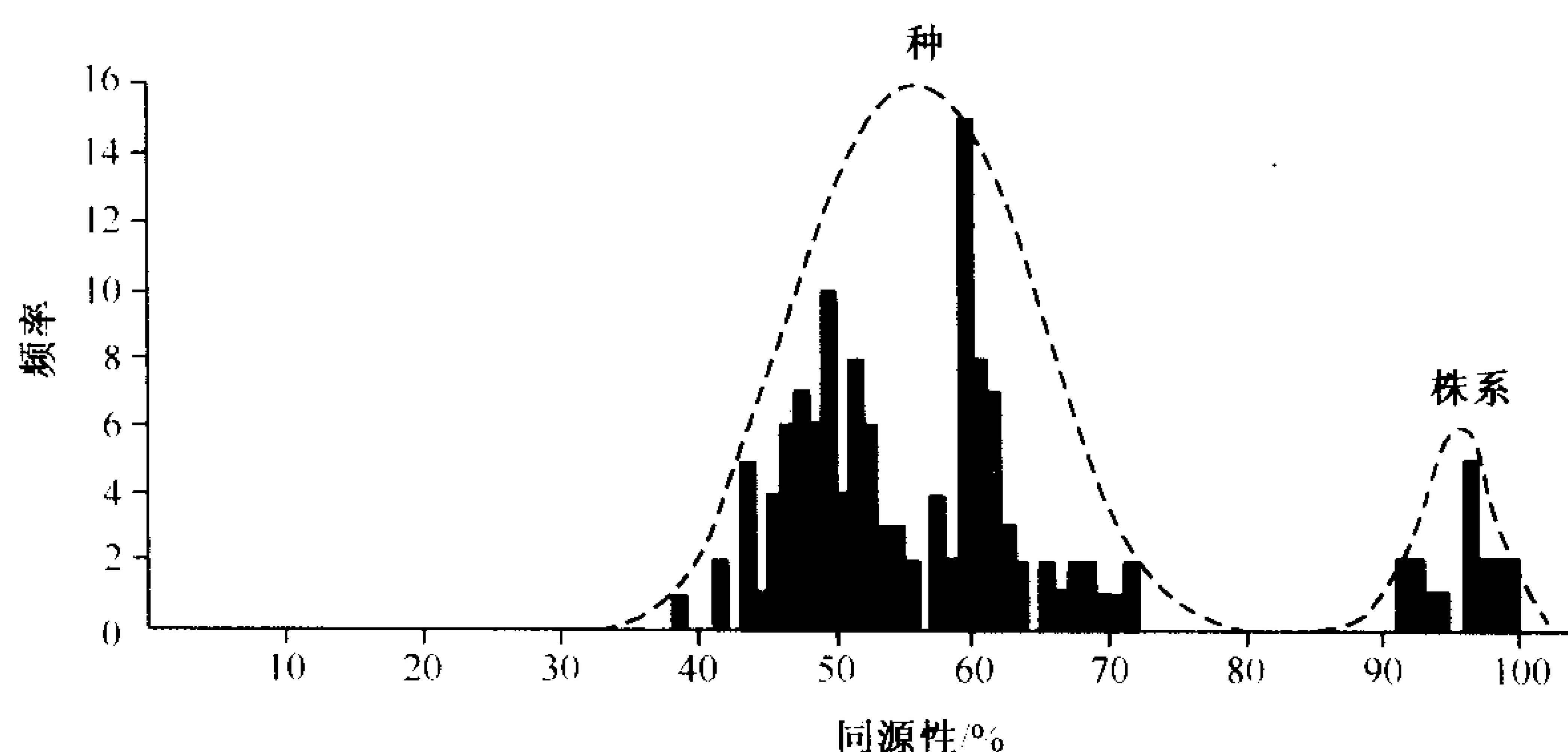


图2.2 不同种的马铃薯Y病毒属病毒（potyviruses）（左边的分布）与同一病毒的不同株系（右边的峰）的外壳蛋白氨基酸序列同源性程度的差别。共分析了8种病毒的17个株系之间136个配对组合。不同病毒间的同源性平均值为54.1%，标准差（standard deviation）为7.29%，而同一病毒的不同株系间的同源性平均值为94.5%，标准差2.56%。虚线表明对不同病毒和不同株系的所有值都位于与其各自的平均值标准差为±3的范围内。经允许，引自Shukla和Ward（1988）。

Fauquet等（1986）用一个称为主要组分分析（principal component analysis）的统计程序，基于外壳蛋白的氨基酸组成所获得的134种植物病毒与株系的归类结果（图2.4）表明它们与由ICTV以前建立的病毒组（Matthews，1982）的相关性相当高。

然而，基于一种蛋白质的系统发育关系（phylogenetic relationship）可能与基于另一种蛋白质的系统发育关系不相似。这暗示着发生了病毒间的重组（参见第8章第Ⅸ节B）。

近年来，获得基因组的核苷酸序列比得到基因产物的氨基酸序列更容易。因此，识别潜在基因产物间的氨基酸序列同源性是可能的，如以前对一些双生病毒（geminiviruses）（Mullineaux *et al.*，1985）和马铃薯Y病毒组病毒（potyviruses）（Domier *et al.*，1987）所做的研究。此类研究已经表明不同分类组（taxonomic group）的病毒在其非结构蛋白之间可能具有氨基酸序列相似性。另一方面，对某个病毒组而言外壳蛋白具有特征性的氨基酸组成（图2.4），而在组之间通常没有显著的氨基酸序列相似性。因此，尽管在大多数病毒基因组中外壳蛋白只代表一小部分信息，但它们似乎是界定许多不同病毒和病毒组的最有用的基因产物。

然而，病毒外壳蛋白的功能并非总是与氨基酸序列相似性相关。例如，AMV和TSV的外壳蛋白是激活基因组RNA起始侵染所必需的（参见第8章第Ⅳ节G）。这两

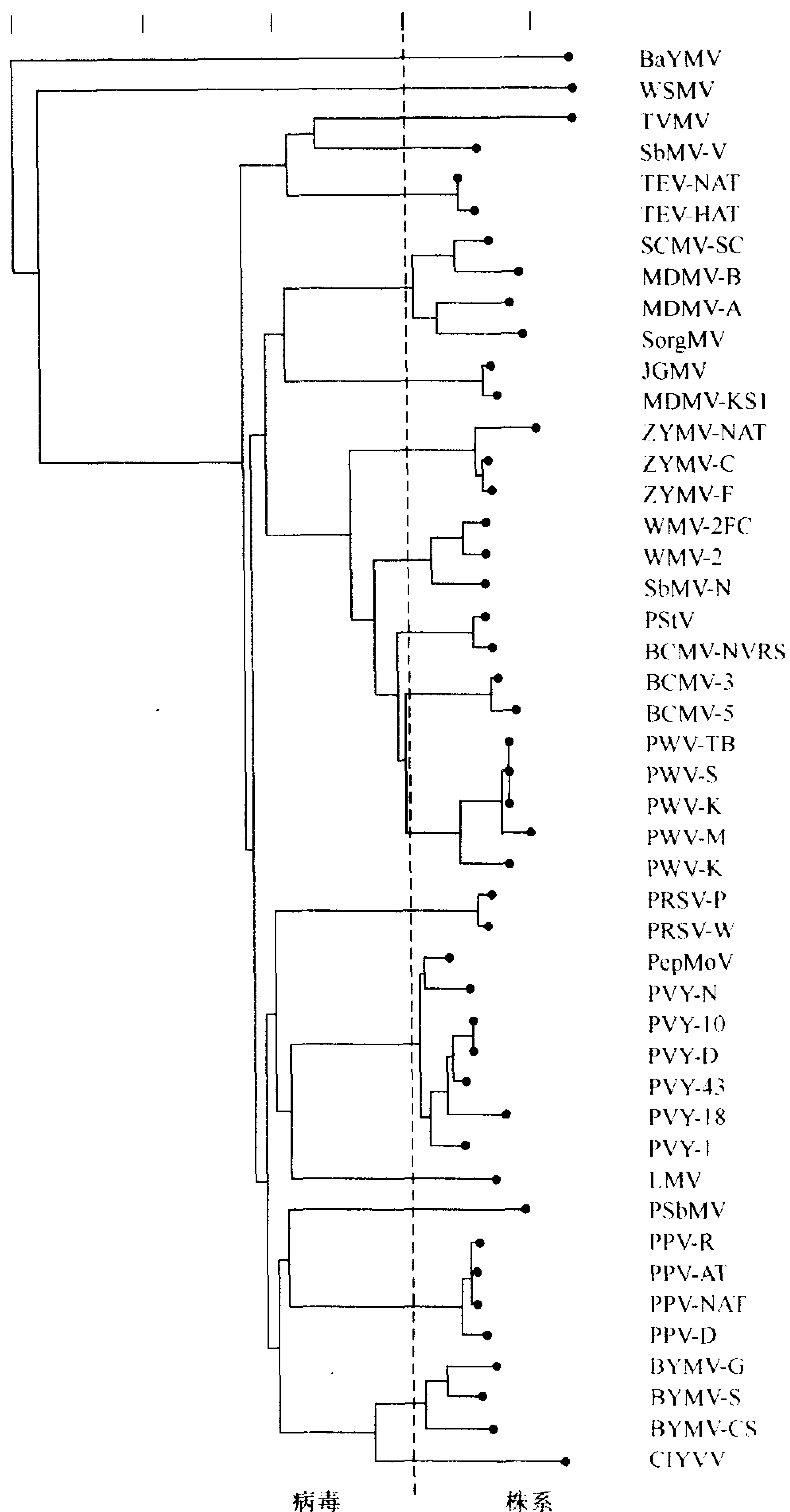


图 2.3　一些马铃薯 Y 病毒属病毒（potyviruses）及其株系之间的关系。本树状图是基于病毒外壳蛋白核心区的氨基酸序列，删去了 5′端与 3′端多变的序列。在将核心区比对后，计算每个序列差异的百分率（即其距离）。将某些序列的空缺处（gap）视为第 21 种氨基酸。利用 Saitou 和 Nei（1987）的相邻相接法（neighbor-joining method），将这些计算出的距离转换成树状图。垂直的虚线表示在病毒种与株系之间一个可能的分界线。经允许，引自 Matthews（1991）。

种病毒的外壳蛋白能够相互激活彼此的基因组，并识别两种 RNA 中相同的核苷酸序列，但是它们之间没有明显的氨基酸序列相似性（Cornelissen and Bol，1984）。

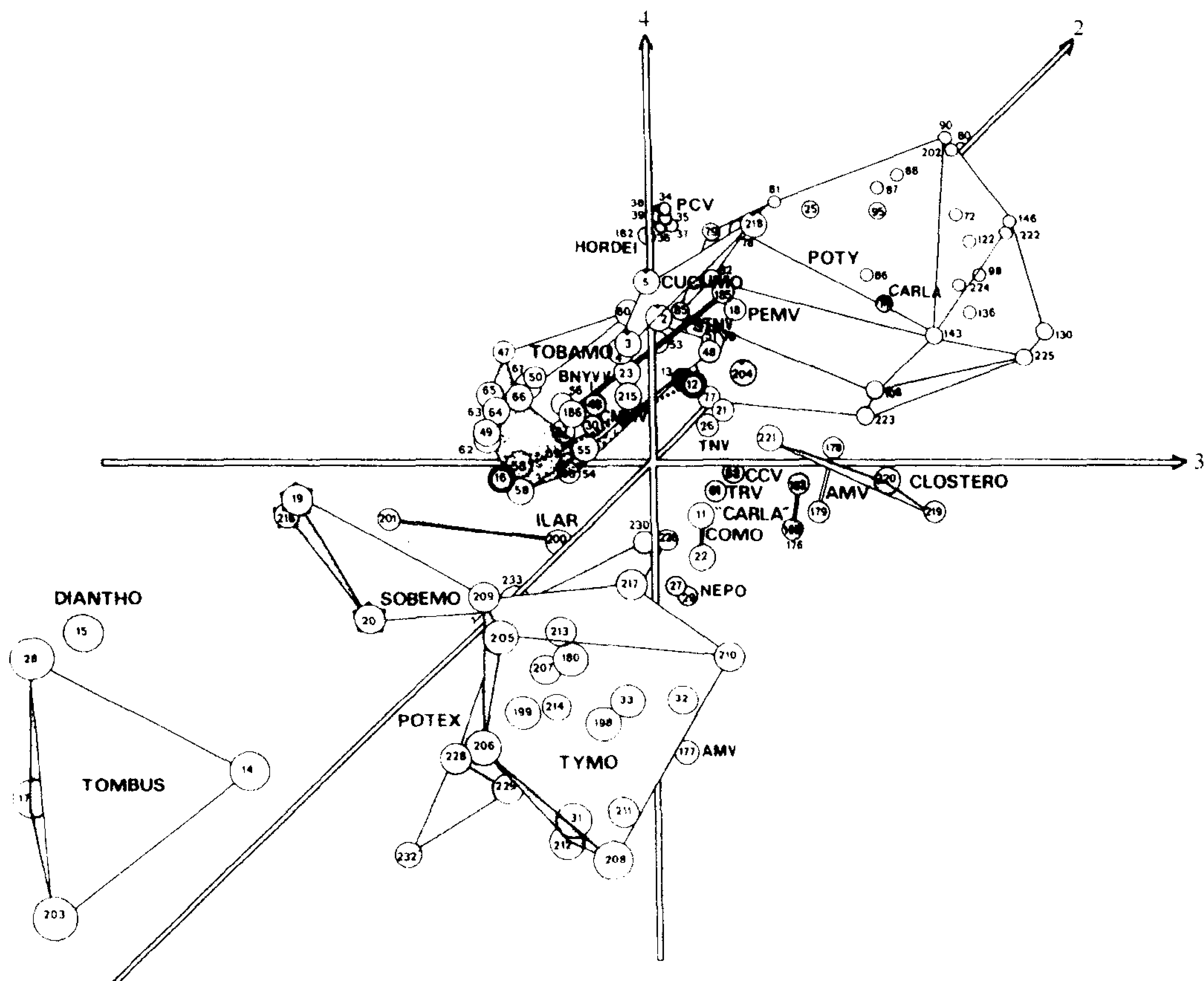


图 2.4　基于植物病毒外壳蛋白的氨基酸组成的 122 个数据集（data set）的主要组分分析所获得的关于因子 2、3 和 4 的三维图。这三个轴包含着 62%的信息。病毒在第二轴上的位置由圆圈的大小来表示。圆圈内的数字为每种病毒的编号。承蒙版权所有者（Karger，Basel）的惠允，引自 Fauquet 等（1986）。

在分类中使用病毒蛋白性质的一个重要目的是要了解一个组中至少一个病毒成员的蛋白质三维结构。这会使我们可以将一个组内不同病毒中的氨基酸替换与生物学功能联系起来。在对 TMV 和 6 个相关病毒的研究中这个目的已经达到（Altschuh *et al.*，1987）。这 7 种烟草花叶病毒属病毒（tobamoviruses）的氨基酸序列同源性为 28%～82%；25 个氨基酸残基在所有 7 个序列中均是保守的（图 2.5）。

在这些保守的残基中，有 20 个集中存在于该分子的两个部位，即在 RNA 结合位点（36～41、88～94 和 113～120）附近 TMV 杆的低半径（low radius）和形成疏水核心（hydrophobic core）（61～63 和 144～145）的高半径处。这 7 种病毒序列存在着差异，但这些差异时常是互补的。例如，在因折叠而被埋没的氨基酸残基之中，大侧链上一个位置的变化可能会被较小的侧链上一个邻近氨基酸的第二个变化所补偿。对烟草花叶病毒属病毒的研究，虽然清楚地界定了分子上有重要功能的区域，但没有得到该病毒组内特有的进化关系的任何明确证据。

其他的病毒基因产物也已经用于分类。如第 8 章（第Ⅳ节 B）所述，有几个主要的

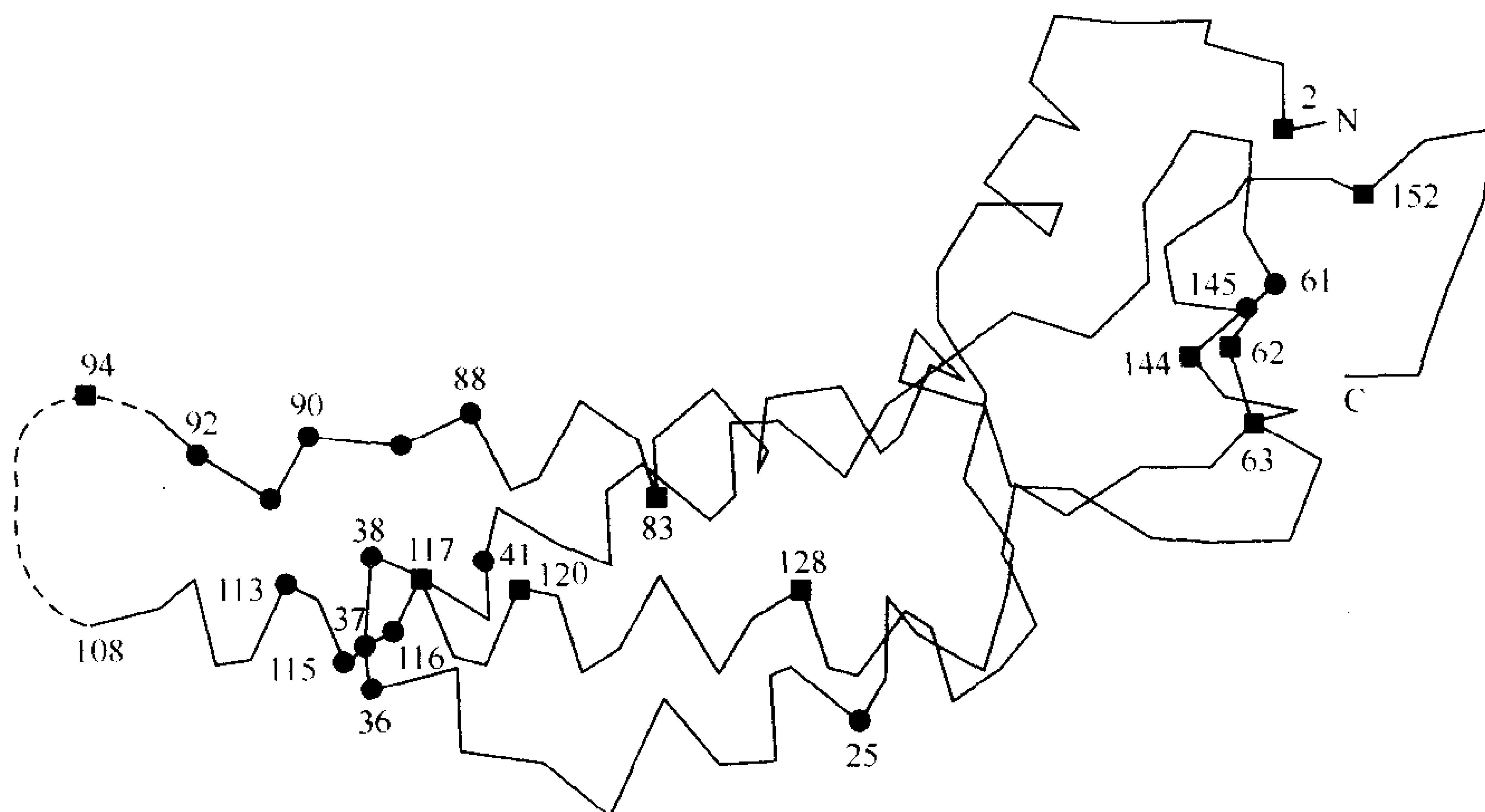


图 2.5　在 7 种烟草花叶病毒属病毒（tobamoviruses）外壳蛋白中保守的氨基酸残基。一个亚基的 α 碳链映绘通过在盘轴的底部观察表现出来。疏水残基（■）与亲水残基（●）的位置均已标出，它们在所有 7 种病毒中的分布一致。经允许，引自 Altschuh 等（1987）。

依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶类群。然而，对这些结果的再评价表明这一个标准不足以支持 RNA 病毒的进化归类（Zanotti *et al.*，1996）。

E. 血清学关系

确定相互关系的血清学方法及其应用的局限性将在第 17 章第Ⅱ节 B 部分讨论。过去，这些方法是将病毒归类到相关组的最重要的单一标准。一些组的成员可能全部是血清学上相关的（如芜菁黄花叶病毒属病毒，tymoviruses）；然而，在其他组里，可能只有数种病毒具有血清学关系（如线虫传多面体病毒属病毒，nepoviruses）。在主要以粒体大小划分的杆状的（rod-shaped）病毒组中，组内的许多病毒是血清学相关的，而在组之间却没有血清学关系。由此看来，对于病毒组的划分，血清学测定（serological test）可能将继续作为一个重要的标准。血清学测定也可用于估计一个组内病毒之间的关系程度（图 2.6）。

就番茄丛矮病毒属病毒（tombusviruses）和芜菁黄花叶病毒属病毒（tymoviruses）而言，不存在图 2.6 所列举的血清学区分指数（serological differentiation index，SDI）值和基因组同源性的估计值之间的相关性。然而，对烟草花叶病毒属病毒而言，在 SDI 值、氨基酸序列和基因组同源性的估计值之间有明显的相关性（Koenig and Gibbs，1986）。血清学方法可用来为一个已建立的病毒组的新病毒确定一系列病毒株系，如烟草花叶病毒属（*Tobamovirus*）的 PMMoV 病毒（Pares，1988）。当限定一个组内相互关系的程度时，有时会出现边界（borderline）情况。在此情况下，还需要其他的标准。

Shukla 等（1989d）使用具有广谱交叉反应的病毒外壳蛋白核心的抗血清证明，由螨类或白粉虱传播的马铃薯 Y 病毒组病毒（potyviruses）和具有蚜虫介体的一种确定的马铃薯 Y 病毒组病毒血清学相关。由于血清学关系复杂且时常不一致，所以一般难以划分不同的马铃薯 Y 病毒组病毒。Shukla 等（1989c）曾将一种系统的免疫化学分析法应用于该病毒组的一些成员。这一方法涉及利用重叠的肽片段（overlapping peptide

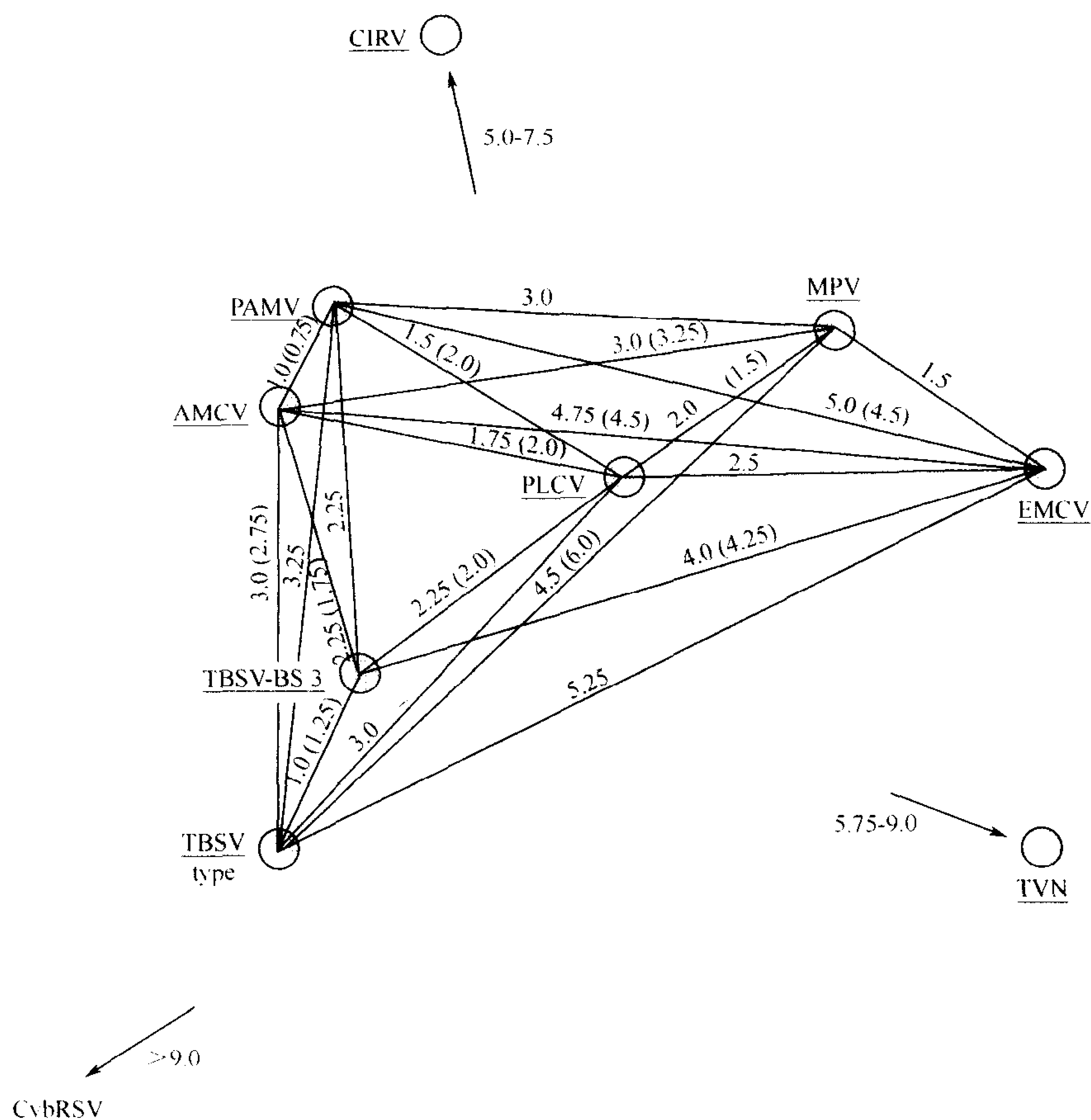


图 2.6 应用血清学估计在一个组中病毒之间的亲缘关系的程度。该图描述了 10 种番茄丛矮病毒属病毒（tombusviruses）的归类，距离表示往复测验（reciprocal test）血清学区分指数（RT-SDI）的平均值。将 RT-SDI 值经过四舍五入使其达到最接近 0.25，而且为了表示二维上的关系，"实测的"与"图示的"（括号中）RT-SDI 值不同，这两种值均表示出来。CIRV、TVN 与 CybRSV 相互间以及与其他 tombusviruses 的亲缘关系均较远，它们形成一个中心簇。在一个多维系统中，这 3 种病毒可能必须分别排列于中心簇的上平面和下平面。箭头表示这些病毒与作为一个整体的中心簇的平均距离，而非与单个病毒的平均距离。TVN 已被重新命名为 NRV。经允许，引自 Koenig 和 Gibbs（1986）。

fragment）以划分与特定抗血清中的抗体结合的蛋白质部位，使得制备病毒特异性（virus-specific）和组特异性的（group-specific）抗血清成为可能。

F. 在植物中的活性

使用生物学特性（如寄主范围和在特定寄主植物上的症状）作为主要的标准，在病毒的鉴定（identification）和分类中导致了相当严重的混乱。随着有关病毒的理化性质方面知识的增加，生物学特性已被认为不太重要。然而，在病毒分类方面，生物学特性仍需得到一定的重视。

宏观症状（macroscopic symptom）的差异时常表明不同病毒株系的存在，除了核

苷酸全序列比较以外，没有其他的标准能做到这一点。电子显微镜技术使得对受侵染的细胞进行详细的细胞学研究成为可能，并证明许多组群的病毒在其侵染的细胞中导致了特异性内含体或其他的细胞学异常（参见第3章第Ⅳ节）。细胞的超微结构变化看来是比宏观症状更加稳定的病毒组的特征。某些番茄丛矮病毒属病毒可通过其细胞病理学（cytopathological）作用，尤其在昆诺藜（*Chenopodium quinoa*）中的作用，与该组的其他成员相区别（Russo *et al.*，1987）。

植物中的交互保护（cross-protection）已经被作为病毒之间相互关系的有用指标（参见第17章第Ⅱ节C4）。

G. 传播的方法

如第11章所述，大多数病毒只有一种类型的传播介体（vector），而且通常一个组里所有的病毒有相同类型的介体。在最近几年，这一特点在划分原来的 *Potyvirus* 和 *Geminivirus* 组内的新属方面已被认为相当重要。一般说来，传播介体的类型看来是稳定的特征，在界定病毒的主要组群方面很有用。然而，在一组病毒或病毒株系群里，有些可能被一种传播介体有效传播，有些则传播效率很差，有些甚至根本不能被传播。一个病毒被一个传播介体传播方式的细节［如病毒的非持久性（non-persistent）或持久性经蚜虫传播的方式，或位于真菌孢子的表面或内部］可能成为病毒归类的进一步标准。然而，在某些情况下，一个保藏的病毒培养物（virus culture）可能失去被一种介体传播的能力，如WTV（参见第11章第Ⅳ节D.2）。

第Ⅲ节　植物病毒的科与属

以下是植物病毒科与属成员典型特征的简介。各个方面的更多细节将在随后的几章中加以介绍，此外，还可参考本书引用的综述性文章和书籍以及ICTV第7次报告（van Regenmortel *et al.*，2000）。这些病毒分类单位的特征将在附录B中进行概括总结。

A. 花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）

该科包括所有复制时经过反转录阶段的植物病毒（Hohn，1999；Schoelz and Bourque，1999）。该科病毒基因组为双链DNA，基因组双链中的一条链上特定的位点有一个不连续区（gap，discontinuity），另一链上有1～3个不连续区；这些不连续区是DNA复制过程中DNA合成时的引发（即引物结合）位点。不对称（asymmetric）转录产生一个比基因组长的（more-than-genome length）RNA，该RNA分子既是反转录的模板，也是一些基因产物的mRNA。此外，还可能转录出其他的mRNA。有关其复制和基因组表达的细节请分别参阅第8章第Ⅶ节以及第7章第Ⅴ节H.1部分。

该科分为6个属，6个属又归为两个组群：具有等轴（isometric）粒体的花椰菜花叶病毒属病毒（caulimoviruses）组群和粒体为杆菌状的杆状DNA病毒属病毒（badnaviruses）组群。根据基因组组构（结构）（genome organization）区别该病毒科的各个属。

1. 花椰菜花叶病毒属（*Caulimovirus*）

该属的典型种为花椰菜花叶病毒（*Cauliflower mosaic virus*）。

花椰菜花叶病毒病毒粒体为直径 50 nm，三角剖分数 $T = 7$，多层结构的二十面体，存在于细胞质内含体（cytoplasmic inclusion body）中。病毒基因组包含 6 个可读框（open reading frame，ORF）其中 5′端的 ORF 以长于基因组的 RNA 为模板进行翻译表达，3′端的 ORF 6 以单独的 mRNA 为模板进行翻译表达。病毒基因组中还可能包含另外两个可读框，但并未发现由它们编码的基因表达产物。该属大多数病毒以蚜虫为介体以半持久性方式（semi-persistent manner）传播，传播时需要病毒编码的辅助蛋白（helper protein）。有关病毒粒体结构的细节参阅第 5 章第Ⅵ节 A. 1 部分，基因组组构的细节参阅第 6 章第Ⅳ节 A. 1，基因组表达的细节参阅第 7 章第Ⅴ节 H. 1 部分，病毒传播的细节参阅第 11 章第Ⅲ节 F 部分。

2. 大豆褪绿斑驳病毒属（*Soymovirus*）

该属的典型种为大豆褪绿斑驳病毒（*Soybean chlorotic mottle virus*）（Reddy and Richins，1999）。与花椰菜花叶病毒属类似但在基因组组构上有差别（参见第 6 章第Ⅳ节 A. 2）。

3. 木薯脉花叶病毒属（*Cavemovirus*）

该属的典型种为木薯脉花叶病毒（*Cassava vein mosaic virus*）（de Kocho，1999）。与花椰菜花叶病毒属类似，但基因组组构不同（参见第 6 章第Ⅳ节 A. 3）。

4. 碧冬茄明脉病毒属（*Petuvirus*）

该属的典型种为碧冬茄明脉病毒（*Petunia vein clearing virus*），与花椰菜花叶病毒属类似，但基因组组构有差别（参见第 6 章第Ⅳ节 A. 4）。

5. 杆状 DNA 病毒属（*Badnavirus*）

该属的典型种为鸭跖草黄斑驳病毒（*Commelina yellow mottle virus*）（Lockhart and Olszewski，1999）。

该属中有几种病毒对热带作物造成严重危害。杆状 DNA 病毒粒体多为 130 nm×30 nm，但少数病毒长一些（最长可达 900 nm），不与细胞质内含体相连。病毒 DNA 基因组包含 3 个可读框，以长于基因组的 RNA 转录物为模板翻译蛋白质产物。ORF 3 编码一个多聚蛋白（polyprotein），在病毒编码的蛋白酶的作用下加工产生衣壳蛋白、天冬氨酸蛋白酶（aspartate protease）、反转录酶和 RNA 酶 H。本属多数病毒由粉蚧（mealybug）为介体以半持久性方式传播。有关该属病毒的基因组组构的细节参见第 6 章第Ⅳ节 A. 5 部分。

6. 东格鲁病毒属（*Tungrovirus*）

该属的典型种为水稻东格鲁杆状病毒（*Rice tungro bacilliform virus*）（Hull，1996；1999a）。与 RTSV 一起引起水稻东格鲁病（tungro）；依靠 RTSV 以叶蝉为介体

传播。病毒粒体与杆状 DNA 病毒属非常相似但病毒基因组包含 4 个可读框，由长于基因组的 RNA 转录物经剪接后产生的 mRNA 翻译出 3′ORF 编码的蛋白质。有关该属病毒粒体的结构、基因组组构与基因组表达的细节请分别参阅第 5 章（第Ⅵ节 B.5 部分）、第 6 章（第Ⅳ节 A.6 部分）和第 7 章（第Ⅴ节 H.1 部分）。

B. 双生病毒科（*Geminiviridae*）

双生病毒科是具有单链 DNA 基因组的两个植物病毒科之一。该科病毒的显著特征是病毒基因组包裹在由两个不完全的正二十面体组成的双生的病毒粒体中（参见第 5 章第Ⅵ节 B.3）（Buck，1999）。根据病毒基因组的结构和传播介体的不同，该科分为 4 个属。

1. 玉米线条病毒属（*Mastrevirus*）

该属的典型种为玉米线条病毒（*Maize streak virus*，MSV）（Palmer and Rybicki，1998）。该属的 MSV 为重要的作物病毒。除 TYDV 和 BeYDV 能够侵染双子叶植物外，该属病毒的寄主范围都很狭窄，它们的寄主范围仅限于禾本科植物。该属病毒通过叶蝉以循回型（circulative）、非增殖型的（non-propagative）方式传播（参见第 11 章第Ⅳ节 D.1）。病毒基因组为单组分单链 DNA（参见第 6 章第Ⅴ节 A.2）。

2. 曲顶病毒属（*Curtovirus*）

该属的典型种为甜菜曲顶病毒（*Beet curly top virus*）。甜菜曲顶病毒曾为甜菜的重要病原，有很宽的寄主范围。该属病毒通过叶蝉以循回、非增殖型的方式传播（参见第 11 章第Ⅳ节 D.1）。病毒基因组为单分体（monopartite）单链 DNA（参见第 6 章第Ⅴ节 A.3）。

3. 菜豆金色花叶病毒属（*Begomovirus*）

该属的典型种为菜豆金色黄花叶病毒（*Bean golden yellow mosaic virus*）。该属为双生病毒科中最大的一个属，该属病毒侵染双子叶植物，寄主范围较为狭窄。通过粉虱传播（参见第 11 章第Ⅴ节 B)。该属的大多数成员基因组由两个 DNA 分子组成（参见第 6 章第Ⅴ节 A.4），但少数成员的基因组为单分体 DNA 分子。

4. 番茄伪曲顶病毒属（*Topocuvirus*）

该属的典型种为番茄伪曲顶病毒（*Tomato pseudo-curly top virus*），是最近从曲顶病毒属中划分出来的一个新属（Pringle，1999a），其基因组组构与曲顶病毒属相似，但由角蝉（*Micrutalis malleifera*）传播。

C. 圆环病毒科（*Circoviridae*）*

该科包括两个属，一个属的成员侵染动物，另一个属的成员侵染植物。它们具有微

* 现在矮缩病毒属已从圆环病毒科中撤出，成立了矮缩病毒科（*Nanoviridae*），包括矮缩病毒属与香蕉束顶病毒属（*Babuvirus*）——译者。

小的正二十面体病毒粒体，直径为 17～22 nm，病毒基因组为单链 DNA。

矮缩病毒属（*Nanovirus*）

该属的典型种为地三叶草矮化病毒（*Subterranean clover stunt virus*），还包括造成严重经济损失的病毒 BBTV。病毒基因组为至少 6 个环状单链 DNA 分子，大小接近 1 kb，包裹在直径约为 20 nm 的正二十面体的病毒粒体中。有关该属病毒的基因组组构和复制机制请分别参见第 6 章第Ⅴ节 B. 1 和第 8 章第Ⅷ节 E 部分。

D. 呼肠病毒科（*Reoviridae*）

呼肠病毒科包括侵染脊椎动物、无脊椎动物和植物的病毒属。其中一些成员仅侵染脊椎动物，另外一些既侵染脊椎动物又侵染无脊椎动物。侵染植物的病毒也侵染其相应的无脊椎动物介体。病毒粒体的组成比较复杂，可具有一、二或三层不同的正二十面体对称结构的衣壳。该科的多数病毒粒体有表面刺突（spike）。不同属的病毒基因组分别由 10、11 或 12 个线性双链 RNA 片段组成。该科中侵染植物的共有 3 个属，划分的依据是病毒粒体的结构和病毒基因组片段的数目。

1. 斐济病毒属（*Fijivirus*）

该属的典型种为甘蔗斐济病毒（*Fiji disease virus*），其基因组为 10 个双链 RNA 片段（参见第 6 章第Ⅵ节 A. 1），包裹在双层衣壳的、直径为 65～70 nm 的正二十面体粒体中。斐济病毒属病毒结构见第 5 章第Ⅶ节 2。这些病毒引起韧皮部的过度生长（hypertrophy）导致叶脉膨胀（vein swelling）或耳突（enation）。通过飞虱（delphacid planthopper）以循回（circulative）、增殖型（propagative）方式传播，侵染禾本科（*Graminae*）和百合科（*Liliaceae*）的单子叶植物。

2. 水稻病毒属（*Oryzavirus*）

该属的典型种为水稻齿叶矮缩病毒（*Rice ragged stunt virus*），病毒基因组为 10 个双链 RNA 片段（基因组组构见第 6 章第Ⅵ节 A. 2），包裹在具有双层衣壳的、直径为 75～80 nm 的正二十面体粒体中（参见第 5 章第Ⅶ节 3）。侵染单子叶植物禾本科，通过飞虱以循回、增殖型方式传播。水稻病毒属病毒（oryzaviruses）与斐济病毒属病毒（fijiviruses）相似的地方是二者的基因组都为 10 个双链 RNA 片段，都通过飞虱传播。二者的不同之处在于病毒粒体的大小和核酸在属内有，但在属间无血清学相似性。

3. 植物呼肠病毒属（*Phytoreovirus*）

该属的典型种为伤瘤病毒（*Wound tumor virus*），病毒基因组为 12 个双链 RNA 片段（基因组组构见第 6 章第Ⅵ节 A. 3），包裹在具有双层衣壳的、直径约为 70 nm 的正二十面体粒体中（参见第 5 章第Ⅶ节 1）。既侵染单子叶也侵染双子叶植物，由叶蝉（leafhopper）以循回、增殖型方式传播。

E. 双分病毒科（*Partitiviridae*）

双分病毒科病毒具有小的等轴、无包被的粒体，直径为 30～40 nm。病毒基因组为双链 RNA，且分为两个片段：小片段编码衣壳蛋白，大片段编码依赖 RNA 的 RNA 聚合酶（Milne and Marzachi，1999）。

该科中有两个属侵染真菌，两个属侵染植物。侵染植物的该科病毒常被称为“隐潜病毒”（cryptic virus），因为它们侵染植物后几乎不引起或很少引起症状。该科病毒既不通过嫁接传播也没有生物介体，但可以通过种子以很高的效率传播。据推测，在细胞分裂时，病毒在植物体内移动可引起系统性侵染。

1. α 隐潜病毒属（*Alphacryptovirus*）

该属的典型种为白三叶草隐潜病毒 1 号（*White clover cryptic virus* 1），具有等轴病毒粒体，直径为 30 nm，表面轮廓看起来较为光滑，缺少结构细节。病毒基因组的大小为 1.7～2 kb，病毒衣壳由一种 55 kDa 蛋白质分子组成。

2. β 隐潜病毒属（*Betacryptovirus*）

该属的典型种为白三叶草隐潜病毒 2 号（*White clover cryptic virus* 2），病毒粒体直径为 38 nm，表现出明显的亚基；病毒基因组的大小为 2.1～2.25 kb，衣壳蛋白亚基的分子质量尚未确定。

F. 未归科的病毒属

巨脉病毒属（*Varicosavirus*）

该属的典型种为莴苣巨脉相关病毒（*Lettuce big-vein associated virus*），病毒粒体棒状，长度为 320～360 nm，直径为 18 nm，病毒衣壳由单一的分子质量为 48 kDa 的蛋白质分子组成。病毒基因组为双链 RNA*。该属病毒以壶菌（*Olpidium*）为传播介体。

G. 弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）

弹状病毒科病毒（rhabdovirus）的显著特征是病毒粒体的形态为子弹状或杆菌状，有包膜（Jackson *et al.*，1999）。衣壳蛋白外表面有糖蛋白刺突穿过包膜。在包膜内表面有一层基质蛋白（matrix protein）包含着螺旋状排列的核壳（nucleocapsid）。核壳由负链 RNA、核蛋白以及少量由病毒核酸编码的其他蛋白质所组成。第 5 章第Ⅷ节 A 部分将介绍该科病毒粒体的结构。弹状病毒可侵染脊椎动物、无脊椎动物以及植物。

弹状病毒中侵染植物的共有两个属，它们与侵染动物的弹状病毒类似，但侵染植物的（少数已经测序的）弹状病毒有一个额外的特殊基因，该基因被认为编码一种细胞间的移动蛋白（参见第 6 章第Ⅶ节 A）。侵染植物的弹状病毒的传播介体是昆虫，以循回、增殖型方式传播。虽然已经鉴定出由螨类（mite）和网蝽（lacebug）传播的弹状病毒

---

* 现在证明该属病毒的基因组为负单链 RNA——译者。

（各一种），但大多数情况下其传播介体为叶蝉、飞虱和蚜虫。

1. 细胞质弹状病毒属（*Cytorhabdovirus*）

该属的典型种为莴苣坏死黄化病毒（*Lettuce necrotic yellows virus*）。该属病毒在核周隙（perinuclear space）或内质网内复制，然后通过出芽（budding）方式进入细胞质中完成成熟过程。大多数成员的病毒粒体相对较小（直径约为 60 nm）。

2. 细胞核弹状病毒属（*Nucleorhabdovirus*）

该属的典型种为马铃薯黄矮病毒（*Potato yellow dwarf virus*）。据认为，该属病毒在核内复制，然后通过出芽穿过内核膜（inner nuclear membrane）进入核周隙。许多成员的病毒粒体相当大（直径约为 90 nm）。

3. 未归属的病毒

许多没有充分鉴定的植物弹状病毒尚未划分到某个属。这些病毒中有些看来缺乏外包膜，因而实质上只具有核蛋白"核心"（Francki *et al.*，1985a）。

H. 布尼亚病毒科（*Bunyaviridae*）

布尼亚病毒科是一个大科，该科的大多数成员既侵染脊椎动物也侵染无脊椎动物。侵染植物的有一个属，该属病毒也侵染其无脊椎动物传播介体。病毒粒体为球形或多形（pleomorphic），表面有糖蛋白刺突镶嵌于双层脂包膜中。在包膜内，由 3 种 RNA 组成的病毒基因组与核蛋白组成核壳。每个核酸链的 5′端和 3′端核苷酸互补形成"锅柄"（panhandle）结构。基因组 RNA 为负链，或编码区为双义（ambisense）排列（参见第 7 章第Ⅴ节 B. 12）。

番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）

该属的典型种为番茄斑萎病毒（*Tomato spotted wilt virus*）（Moyer，1999）。包裹在带包膜的病毒粒体内（参见第 5 章第Ⅷ节 B）的番茄斑萎病毒属病毒（tospoviruses）基因组有 3 种单链 RNA，最大的一种为负链 RNA，其余两种为双义 RNA（参见第 6 章第Ⅶ节 B. 1）。一种基因产物参与了病毒在细胞间的移动（参见第 9 章第Ⅱ节 D. 1. j），这点是该属与布尼亚病毒科其他属的区别所在。

番茄斑萎病毒属病毒由蓟马（thrips）以循回、增殖型方式传播（参见第 11 章第Ⅵ节 B）。TSWV 的寄主范围包括 70 个科的 925 种植物。

I. 未归科的病毒属

有两个属与布尼亚病毒科相似，但目前缺乏足够的证据将它们正式归类于该病毒科。

1. 纤细病毒属（*Tenuivirus*）

该属的典型种为水稻条纹病毒（*Rice stripe virus*）（Falk and Tsai，1998；Falk，

1999)。迄今已鉴定的该属病毒粒体由很长的细丝状核蛋白所组成，直径为 3～10 nm，两端相接常形成环状轮廓。尽管这些核蛋白具有的基因组组构的各种特征显示与布尼亚病毒科成员，尤其是与白蛉热病毒属（*Phlebovirus*）相似，但是还没有检测到与包膜相结合的粒体。病毒基因组由 4 个或更多的片段组成，最大的片段为负链 RNA，其他 3 个或更多的片段为双义 RNA（参见第 6 章第Ⅶ节 C）。

纤细病毒属病毒侵染禾本科植物并由飞虱以循回、增殖型方式传播。

2. 蛇状病毒属（*Ophiovirus*）*

该属的典型种为柑橘鳞皮病毒（*Citrus psorosis virus*）。蛇状病毒属病毒（ophioviruses）基因组与纤细病毒属病毒相似，病毒粒体为纤丝状的核壳，直径大约为 3 nm，常形成环状。病毒基因组分为 3 段，与一种大小为 43～50 kDa 的蛋白质形成核蛋白。

未发现该属病毒的自然传播介体。该属病毒既侵染双子叶植物也侵染单子叶植物。

J. 雀麦花叶病毒科（*Bromoviridae*）

该科病毒具有 $T=3$ 的二十面体对称性，直径为 26～35 nm 的等轴粒体或基于二十面体对称性的杆菌状粒体。病毒基因组为线性正单链 RNA，分为 3 段（参见第 6 章第Ⅷ节 A）。编码衣壳蛋白的亚基因组（subgenomic）RNA 也常被包壳；该科的一些成员也包裹卫星 RNA 或缺损干扰 RNA。

1. 雀麦花叶病毒属（*Bromovirus*）

该属的典型种为雀麦花叶病毒（*Brome mosaic virus*）（Ahlquist，1999）。雀麦花叶病毒属的病毒粒体为等轴，直径大约为 27 nm，病毒粒体受依赖于 pH 的蛋白质间互作和蛋白质与 RNA 间互作而稳定。在 pH>7 时，粒体开始膨胀并且变得在盐溶液中不稳定（salt labile）。病毒衣壳由 180 个大小为 20 kDa 的蛋白质构成。

该属病毒的自然寄主范围狭窄。可能该属所有病毒都由甲虫传播，有些病毒也可能自然地通过机械方式传播（参见第 12 章第Ⅱ节 F 部分）。

2. 黄瓜花叶病毒属（*Cucumovirus*）

该属的典型种为黄瓜花叶病毒（*Cucumber mosaic virus*）（Roossinck，1999a）。该属病毒病毒粒体为等轴，直径大约为 30 nm，稳定性依赖于蛋白质与 RNA 间的互作，在盐溶液中不稳定。病毒衣壳由 180 个大小为 24 kDa 的同种蛋白质构成。

黄瓜花叶病毒（CMV）的寄主范围较广，能侵染 85 科以上 10 000 多种植物。该属其他病毒的寄主范围较窄。CMV 由蚜虫以非持久性方式传播，根据血清学和核苷酸序列分为两个亚组（subgroup）（Ⅰ和Ⅱ）（表 2.3）。PSV 可能也存在几个亚组。

3. 苜蓿花叶病毒属（*Alfamovirus*）

该属的典型种（也是唯一的种）为苜蓿花叶病毒（*Alfalfa mosaic virus*）（Bol，

---

* 该属最近已被批准升级为科，即蛇状病毒科（*Ophioviridae*）——译者。

表 2.3 CMV 的两个亚组和黄瓜花叶病毒属的其他两种病毒之间各个 RNA 分子的核苷酸序列相似性
引自 Roossinck (1999a)

病毒	CMV-Ⅰ	CMV-Ⅱ	PSV	TAV
RNA1				
CMV-Ⅰ	100	78	68	70
CMV-Ⅱ		100	70	69
PSV			100	68
RNA2				
CMV-Ⅰ	100	74	65	64
CMV-Ⅱ		100	66	66
PSV			100	64
RNA3				
CMV-Ⅰ	100	78	64	65
CMV-Ⅱ		100	65	66
PSV			100	72

1999)。该单种属(monospecific genus)的病毒粒体为杆菌状，直径为 18 nm，长为 30～57 nm,粒体长短取决于包裹在 24 kDa 的衣壳蛋白中的病毒 RNA 种类(片段大小)(参见第 5 章第Ⅳ节 B. 2 部分)。病毒粒体的稳定性主要取决于蛋白质与 RNA 间的互作，因而是盐不稳定性的。衣壳蛋白或编码它的亚基因组 RNA 的存在是病毒的复制所必需的(参见第 8 章第Ⅳ节 G)。由于序列的相似性，有人建议 AMV 应该划分到等轴不稳环斑病毒属(Scott *et al.*，1998)

AMV 的寄主范围较宽，由蚜虫以非持久性方式传播。

4. 等轴不稳环斑病毒属(*Ilarvirus*)

该属的典型种为烟草线条病毒(*Tobacco streak virus*)(Bol，1999)。该属的病毒粒体为准等轴的(quasi-isometric)形态，从近球形到杆菌状。病毒粒体的稳定性主要取决于蛋白质与 RNA 间的互作，因而是盐不稳定性的。该属的病毒与 AMV 一样，其衣壳蛋白(24～26 kDa)或编码它的亚基因组 RNA 的存在是病毒的复制所必需的，可由 AMV 的衣壳蛋白取代。

该属病毒大多侵染木本植物，由花粉和种子传播。

根据血清学关系等轴不稳环斑病毒属的病毒被分为 7 个或 8 个亚组或类群(cluster)(Bol，1999)。

5. 油橄榄病毒属(*Oleavirus*)

该属的典型种为油橄榄病毒 2 号(*Olive latent virus* 2，OLV-2)。该属病毒粒体的形状和大小变化不定，可能是准球形直径为 26 nm，也可能是杆菌状，直径 18 nm，长为 55 nm、48 nm、43 nm 或 37 nm。病毒基因组 RNA 分为三段，病毒衣壳内同时包含有一个非衣壳蛋白 mRNA 的亚基因组 RNA。衣壳蛋白分子质量为 20 kDa。

油橄榄病毒 2 号的自然传播介体尚不清楚。

K. 豇豆花叶病毒科（*Comoviridae*）

病毒粒体为等轴、$T=1$（拟 $T=3$）的二十面体对称结构（粒体结构见第 5 章第Ⅵ节 B. 6. a）。病毒衣壳由一种或两种衣壳蛋白组成，病毒基因组包含两条正单链 RNA。病毒基因组 RNA 翻译采取多聚蛋白（polyprotein）策略（参见第 6 章第Ⅷ节 B），进而加工为功能蛋白质（参见第 7 章第Ⅴ节 E. 8）。

1. 豇豆花叶病毒属（*Comovirus*）

该属的典型种为豇豆花叶病毒（*Cowpea mosaic virus*）（Lomonossoff and Shanks，1999）。

病毒衣壳由两种多肽组成（分子质量分别为 40～45 kDa 和 21～27 kDa），这两种多肽是从较小的 RNA 分子翻译表达出来的（参见第 6 章第Ⅷ节 B. 1）。

该属病毒由叶甲（chrysomelid beetle）传播。

2. 蚕豆病毒属（*Fabavirus*）

该属的典型种为蚕豆萎蔫病毒 1 号（*Broad bean wilt virus* 1）（Cooper，1999）。与豇豆花叶病毒属病毒一样，蚕豆病毒衣壳由两种蛋白质组成，大小与豇豆花叶病毒属病毒的相似，同样是从较小的 RNA 分子翻译表达出来的（参见第 6 章第Ⅷ节 B. 2）。

蚕豆病毒属病毒由蚜虫以非持久性方式传播。

3. 线虫传多面体病毒属（*Nepovirus*）

该属的典型种为烟草环斑病毒（*Tobacco ringspot virus*）（Murant *et al.*，1996；Mayo and Jones 1999a）。烟草环斑病毒（TRSV）的病毒衣壳由一种多肽（52～60 kDa）组成，该属其他病毒衣壳可能由两三种较小的蛋白质组成。基因组组构与豇豆花叶病毒属病毒相似（参见第 6 章第Ⅷ节 B. 3）。

线虫传多面体病毒属病毒侵染植物常引起环斑症状。多数成员由长针线虫（longidorid nematode）传播（参见第 11 章第Ⅺ节 E），一些由花粉传播，一种（BRAV）由螨传播，其余的传播介体尚不清楚。

根据 RNA 2 的长度和装配以及血清学关系将该属病毒分为 3 个亚组：a、b 和 c（Murant，1981）。

L. 马铃薯 Y 病毒科（*Potyviridae*）

该科（Shukla *et al.*，1994；López-Moya and Garcia，1999）病毒粒体为线状，（11～15）nm×（650～900）nm，大麦黄化叶病毒属病毒为二分体。病毒基因组为正单链 RNA，5′端有一个 VPg，3′端有 poly(A)尾；大麦黄化叶病毒属（*Bymovirus*）基因组分为两个片段。基因组首先表达出多聚蛋白（参见第 6 章 C），随后剪切加工为功能蛋白（参见第 7 章第Ⅴ节 B. 1. b）。

该科所有的病毒均在受侵染细胞内形成柱状（风轮状）内含体（参见第 3 章第Ⅳ节 C）。可由多种介体传播，传播介体类别是分属的依据之一。

1. 马铃薯Y病毒属（*Potyvirus*）

该属的典型种为马铃薯Y病毒（*Potato virus Y*），病毒粒体长680～900 nm，直径为11～13 nm，病毒衣壳由一种分子质量为30～47 kDa的蛋白质组成，基因组大小约9.7 kb。

该属病毒由蚜虫借助辅助因子（helper component）以非持久性方式传播（参见第11章第Ⅲ节E）。也有一些病毒依靠种子传播（参见第12章第Ⅲ节A）。该属是最大的一个植物病毒属（91个种、88个暂定种），同时包括一些具有重要经济意义的植物病毒如PVY、BYMV、PPV和PRSV。

2. 甘薯病毒属（*Ipomovirus*）

该属的典型种为甘薯轻斑驳病毒（*Sweet potato mild mottle virus*）。该属的病毒粒体长800～950 nm，病毒衣壳由一种分子质量为38 kDa的蛋白质组成，基因组大小为10.8 kb。传播介体为烟粉虱（*Bemisia tabaci*），以非持久性方式传播。

3. 柘橙病毒属（*Macluravirus*）

该属的典型种为桑橙属花叶病毒（*Maclura mosaic virus*）。该属的病毒粒体长为650～675 nm，病毒衣壳由一种分子质量为33～34 kDa的蛋白质组成，基因组大小为8 kb。由蚜虫以非持久性方式传播。

4. 黑麦草花叶病属（*Rymovirus*）

该属的典型种为黑麦草花叶病毒（*Ryegrass mosaic virus*）。该属的病毒粒体长为650～675 nm，直径为11～15 nm。病毒衣壳由一种分子质量为29 kDa的蛋白质组成，基因组大小为9～10 kb。由瘿螨（eriophyid mite）传播（参见第11章第Ⅸ节A）。

5. 小麦花叶病毒属（*Tritimovirus*）

该属的典型种为小麦线条花叶病毒（*Wheat streak mosaic virus*）。病毒粒体长为690～700 nm，病毒衣壳由一种分子质量为32 kDa的蛋白质组成，基因组大小为8.5～9.6 kb。该属病毒仅侵染禾本科植物，可能由瘿螨以持久性方式传播（参见第11章第Ⅸ节A）。

6. 大麦黄花叶病毒属（*Bymovirus*）

该属的典型种为大麦黄花叶病毒（*Barley yellow mosaic virus*）。病毒粒体为弯曲线状、二分体，直径为13 nm，短的粒体长度为250～300 nm，长的粒体长度为500～600 nm。病毒基因组由两个RNA分子组成，长的粒体包含的RNA分子大小为7.5～8.0 kb，短粒体包含的RNA分子大小为3.5～4.0 kb。病毒衣壳由一种分子质量为28～33 kDa的蛋白质组成。该属病毒仅侵染禾本科植物，由禾谷多黏菌（*Polymyxa graminis*）传播。

M. 番茄丛矮病毒科（*Tombusviridae*）

该科病毒粒体为等轴、$T=3$ 的二十面体对称结构，直径为 32～35 nm（参见第 5 章第Ⅵ节 B. 4. d）。病毒基因组为正单链 RNA，大小为 3. 7～4. 7 kb。该科病毒基因组组构在属间有差异（参见第 6 章第Ⅷ节 D）。该科病毒有一个共同特征就是各成员有一个高度保守的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶，编码该酶的基因被一个符合可读框的终止密码子所中断，而该终止密码子受到周期性的抑制后发生通读（参见第 7 章第Ⅳ节 B. 9）。

该科成员单独的寄主范围相当窄，可能侵染单子叶植物或双子叶植物，但不能同时侵染二者。该科病毒相当稳定，许多成员可以在自然环境下如表面水和土壤中存在并可分离出来而不需要生物介体。

1. 番茄丛矮病毒属（*Tombusvirus*）

该属的典型种为番茄丛矮病毒（*Tomato bushy stunt virus*）（Rochon，1999）。该属病毒基因组大小约为 4. 7 kb，病毒粒体直径为 32～35 nm，粒体的细微结构已经得到充分的鉴定（参见第 6 章第Ⅷ节 D. 1）。病毒衣壳由 180 个分子质量为 41 kDa 的蛋白质亚基组成。

该属的多数病毒是土传（soil-borne）的，无明显生物介体。CNV 由壶菌（*Olpidium bornovanus*）传播。

2. 绿萝病毒属（*Aureusvirus*）

该属的典型种为绿萝潜隐病毒（*Pathos latent virus*，PoLV）。该属只有一个种，绿萝潜隐病毒（PoLV），基因组大小约 4. 7 kb，病毒粒体为等轴，直径 30 nm，具有圆形的轮廓和充满突起的表面，病毒衣壳由 180 个 41 kDa 的蛋白质组成。

PoLV 目前报道仅在意大利南部发生。其自然传播是经土壤或溶液培养设施（hydroponics）的循环溶液发生的。

3. 燕麦病毒属（*Avenavirus*）

该属的典型种也是唯一的种为燕麦褪绿矮化病毒（*Oat chlorotic stunt virus*，OCSV）。该病毒衣壳蛋白亚基的分子质量为 48. 2 kDa，显著大于番茄丛矮病毒科其他具有突出的结构域（protruding domain）的大多数病毒的衣壳蛋白。病毒等径粒体的直径为 35 nm，基因组大小为 4114 nt，其基因组组构参见第 6 章第Ⅷ节 D. 3 部分。

迄今有关 OCSV 寄主范围的报道只限于燕麦（*Avena sativa*）。其自然传播的方式为土传，可能通过土壤中产生游动孢子的真菌（zoosporic fungi）传播。

4. 香石竹斑驳病毒属（*Carmovirus*）

该属的典型种为香石竹斑驳病毒（*Carnation mottle virus*）（Qu and Morris，1999）。该属病毒基因组大小为 3. 88～4. 45 kb，等轴病毒粒体的直径为 32～35 nm。电子显微镜下可观察到病毒粒体有规则的颗粒状表面结构，但看不到亚基的排列。粒体为

$T=3$ 的二十面体对称结构，病毒衣壳由 180 个分子质量为 36～41 kDa 的一种蛋白质亚基组成。该属病毒的基因组组构参见第 6 章第Ⅷ节 D.4 部分。

5. 玉米褪绿斑驳病毒属（*Machlomovirus*）

该属的典型种也是唯一的种为玉米褪绿斑驳病毒（*Maize chlorotic mottle virus*，MCMV）（Lommel，1999b）。玉米褪绿斑驳病毒（MCMV）的粒体直径约 30 nm，基因组大小为 4.4 kb，病毒衣壳亚基的分子质量为 25 kDa。有关该病毒基因组组构的细节参见第 6 章第Ⅷ节 D.5 部分。

MCMV 的寄主范围仅局限于禾本科成员。该病毒主要由种子传播，据报道也可由叶甲和蓟马传播。

6. 坏死病毒属（*Necrovirus*）

该属的典型种为烟草坏死病毒 A（*Tobacco necrosis virus A*）（Meulewaeter，1999）。坏死病毒属病毒的粒体直径约为 28 nm，病毒衣壳由 180 个 30 kDa 蛋白质亚基组成。病毒基因组为线性单链 RNA，大小为 3.7 kb，有关该属病毒基因组组构的细节参见第 6 章第Ⅷ节 D.6 部分。

坏死病毒属病毒的寄主范围较广，包括单子叶植物与双子叶植物。自然条件下病毒的侵染仅限于植物根部。该属病毒由壶菌（*Olpidium brassicae*）传播（参见第 11 章第Ⅻ节）。

7. 黍病毒属（*Panicovirus*）

该属的典型种为黍花叶病毒（*Panicum mosaic virus*），病毒基因组 RNA 大小为 4.3 kb，等轴病毒粒体的直径约为 30 nm，病毒衣壳由 180 个 26 kDa 的蛋白质亚基组成。与玉米褪绿斑驳病毒属一样，黍病毒属的 RNA 聚合酶 N 端延伸融合于聚合酶的其余部分形成通读蛋白，这对于番茄丛矮病毒科的聚合酶而言是保守的翻译策略（参见第 6 章第Ⅷ节 D.7）。

寄主范围仅局限于禾本科成员。该病毒很可能是通过机械方式进行自然传播的。

8. 香石竹病毒属（*Dianthovirus*）

该属的典型种为香石竹环斑病毒（*Carnation ringspot virus*）（Lommel，1999a）。

香石竹病毒属病毒不同与番茄丛矮病毒科其他成员的方面在于其基亚组分为两个单链 RNA 分子；有关该属病毒基因组组构的细节参见第 6 章第Ⅷ节 D.8 部分；两种 RNA 包裹在直径为 32～35 nm、由 180 个大小为 37～38 kDa 的蛋白质亚基组成的、二十面体对称结构的等轴病毒粒体中。

香石竹病毒的寄主范围相对较广，限于双子叶植物。很容易经由土壤传播，但尚无有关生物介体的报道。

N. 伴生病毒科（*Sequiviridae*）

该科病毒的粒体为等轴，直径为 30 nm。病毒基因组为正单链 RNA，大小为 9～

12 kb。病毒衣壳由3种蛋白质组成，大小分别为32 kDa、26 kDa和23 kDa；这3种蛋白亚基的分子数相同。基因组RNA编码一个多聚蛋白，随后经剪切加工为功能蛋白。

1. 伴生病毒属（*Sequivirus*）

该属的典型种为欧防风黄点病毒（*Parsnip yellow fleck virus*，PYFV）（Mayo and Murant，1999a）。病毒基因组RNA大小约为10 kb，没有多聚腺苷酸［poly（A）］尾（参见第6章第Ⅷ节E.1基因组组构）。由蚜虫以半持久性（semi-persistent）、非循回型方式传播；欧防风黄点病毒（PYFV）的传播需要辅助病毒　　矮化病毒属的AYV。

2. 矮化病毒属（*Waikavirus*）

该属的典型种为水稻东格鲁球状病毒（*Rice tungro spherical virus*）（Gordon，1999）。病毒基因组RNA大小超过11 kb，3′端有poly(A)尾。已有报道证实基因组RNA 3′端附近有一个或多个小可读框，但不确定它们是否得到表达（参见第6章第Ⅷ节E.2基因组组构）。

矮化病毒属病毒由叶蝉或蚜虫以半持久性、非循回型方式传播，据认为病毒的传播需要一个或多个病毒编码的辅助蛋白（helper protein）参与。

O. 长线病毒科（*Closteroviridae*）

长线病毒科（German-Retana *et al.*，1999）成员的病毒粒体为弯曲线状，粒体直径约为12 nm。具体长度因属而异，是分属的主要特征。病毒基因组核酸为线性正单链RNA，病毒基因组因属而异，可以是单分体或二分体。

该科成员的寄主范围通常较为狭窄。这些病毒侵染植物后局限于韧皮部，引起黄化类型的症状或木质茎的凹陷（pitting，grooving）症状。传播方式是一个重要的分属指标，因而以后有可能重新划分为蚜虫传播、粉虱传播和粉蚧传播的病毒属。

1. 长线病毒属（*Closterovirus*）

该属的典型种为甜菜黄化病毒（*Beet yellows virus*，BYV）（Bar-Joseph *et al.*，1997；German-Retana *et al.*，1999）。弯曲线状的病毒粒体长1250～2000 nm，粒体的一端包被着一种异常的衣壳蛋白，使粒体呈现“响尾蛇”状的结构（图5.12）。就大多数种而言，病毒粒体长度基本恒定，因种而异，但CTV还有包含亚基因组或缺损性RNA的较短的病毒粒体。全长的（full-length）病毒粒体包含单一的RNA种类，大小为15.5～19.3 kb基因组组构的细节请参见第6章第Ⅷ节F.1部分。

自然传播介体因种而异，一般为蚜虫、粉蚧或粉虱（*Trialeuroides*）。CTV和BYV都可导致严重的病害。

2. 毛形病毒属（*Crinivirus*）

该属的典型种为莴苣侵染性黄化病毒（*Lettuce infectious yellows virus*）。毛病毒属病毒粒体有两种长度，一种长700～900 nm，另一种长650～850 nm。与长线病毒一样，粒体的一端包被着一种异常的衣壳蛋白，使粒体呈现“响尾蛇”状的结构；主要的

病毒衣壳蛋白（major coat protein）大小为28～33 kDa。病毒基因组分为两个片段，分别被衣壳蛋白壳体化，因而形成上述两种粒体。

该属病毒的自然传播介体为粉虱（*Bemisia* 属和 *Trialeuroides* 属），以半持久性方式传播。

P. 黄症病毒科（*Luteoviridae*）

该科病毒（Smith and Barker，1999；Mayo and Miller，1999；Miller，1999）为二十面体对称结构的等轴病毒粒体，$T=3$，直径为25～30 nm，轮廓为六边形，蛋白质外壳由180个分子质量为21～23 kDa的一种蛋白质亚基组成。每个病毒粒体只含有一个基因组RNA分子，病毒基因组为正单链RNA，大小为5.7～5.9 kb。病毒基因组组构是分属的依据（参见第6章第Ⅷ节G）。

该科的许多成员侵染后仅局限于韧皮部引起“黄化”（yellow）类型的病害。因此luteovirus这个词来自拉丁语的“luteus”（黄色）。该科的病毒由蚜虫以特异性的、循回型、非增殖型方式传播（参见第11章第Ⅲ节H.1.a）。这些病毒经常协助其他病毒传播（参见第11章第Ⅲ节H.1.a）。

该科成员基因组的序列测定已导致分类方面的重大重组（reorganization）。

1. 黄症病毒属（*Luteovirus*）

该属的典型种为大麦黄矮病毒PAV（*Barley yellow dwarf virus-PAV*）。该属病毒仅侵染禾本科植物，引起严重危害。

2. 马铃薯卷叶病毒属（*Polerovirus*）

该属的典型种为马铃薯卷叶病毒（*Potato leafroll virus*）。该属有些病毒成员侵染双子叶植物，但其他病毒仅侵染单子叶植物。它们也同样引起严重危害。

3. 耳突花叶病毒属（*Enamovirus*）

该属的典型种为豌豆耳突花叶病毒（*Pea enation mosaic virus* 1，PEMV-1）。豌豆耳突花叶病是由两种病毒，PEMV-1和PEMV-2，引起的复合病害，前者是黄症病毒科成员，而后者是一种幽影病毒属病毒（umbravirus）（Demler *et al.*，1993；1994a）。存在着两种等轴粒体：PEMV-1的粒体为二十面体对称结构，直径为28 nm；PEMV-2粒体为准二十面体对称结构，直径为25 nm（参见第5章第Ⅵ节B.4.f）。两种病毒粒体都是由PEMV-1编码的外壳蛋白组成的。PEMV-1能侵染植物原生质体，但在植株中移动需要PEMV-2的存在。与黄症病毒科的其他成员不同的是，豌豆耳突花叶病除可经由蚜虫传染外，亦可通过机械方式传染，并且可传到叶肉组织中；这后两种特性都是由PEMV-2赋予的。PEMV-1+PEMV-2的一些株系的粒体还包含有一种卫星RNA。

PEMV-1+PEMV-2的蚜传特性是由PEMV-1决定的。经过多次机械传播以后，蚜传特性有可能丧失。早已发现了蚜传和非蚜传病毒分离株粒体的电泳谱（electrophoretic profile）的差异（Hull，1977）（图2.7），但引起这些差异的原因尚不完全清楚。

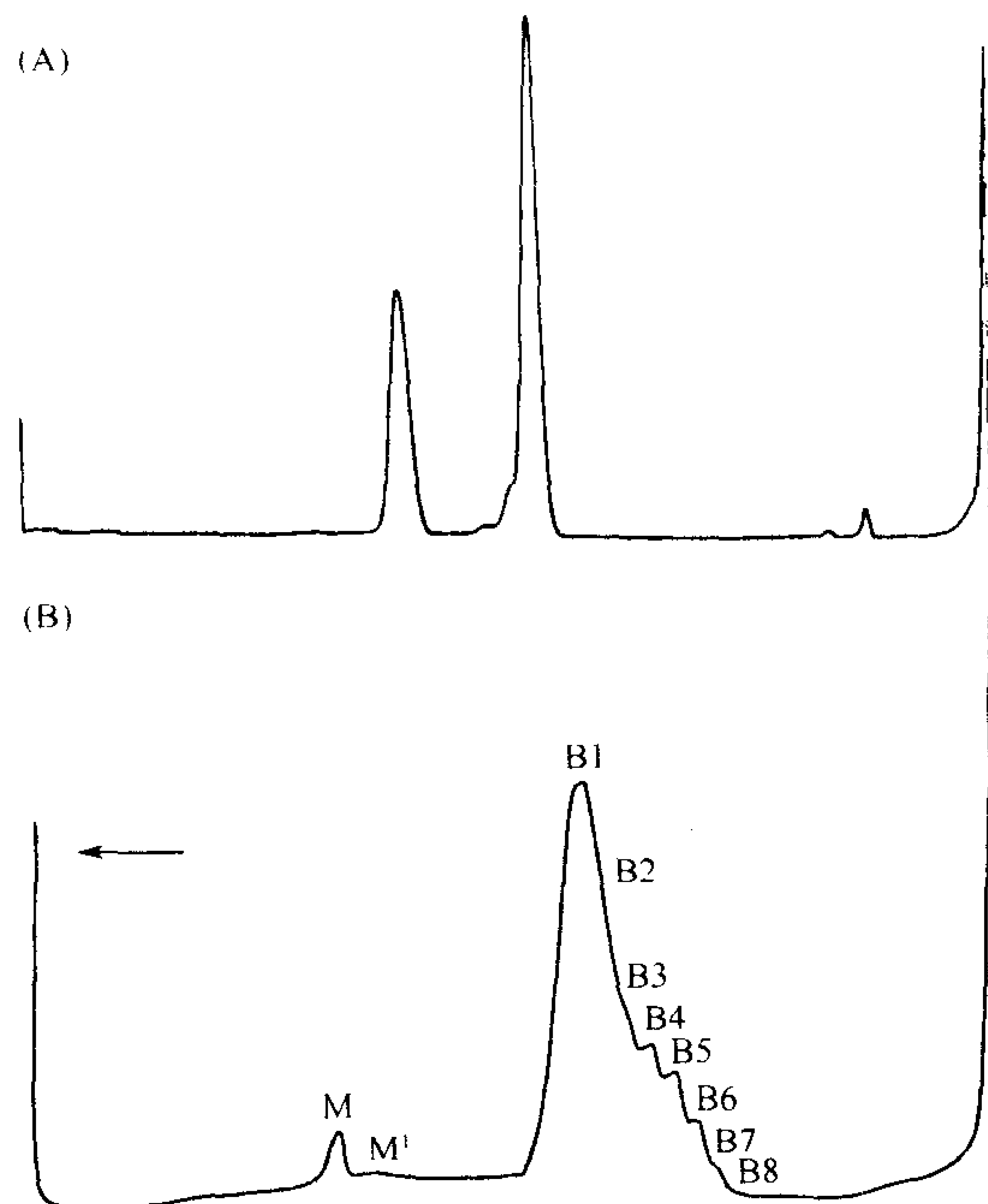


图 2.7 PEMV 不可经蚜虫传播的一个分离株（A）与一个可经蚜虫传播的分离株（B）的核蛋白在电泳后的密度计测定图。电泳是在 3.4%的聚丙烯酰胺凝胶中以 16 V/cm 的电压在 Hull 和 Lane（1973）报道的缓冲液系统中经过 16h 完成。经允许，引自 Hull（1977b）。

4. 未归类到属的病毒

已知 11 种病毒具有黄症病毒科病毒的特征，但目前尚缺乏将其划分到某个属的充分证据。

Q. 悬浮属（Floating genera）

共有 20 个属的正单链 RNA 病毒尚未划分到适当的科里*。在此，将具有类似特征的病毒放在一起按顺序描述，首先是棒杆状（rod-shaped）病毒，然后是具有等径粒体的球状病毒。前两个属的病毒具有直杆状粒体。同时在基因组组构上有一些相似性。第 3～9 属的病毒具有弯曲的杆状粒体，基因组为一个 RNA 分子；其中几个属最近从更大的组群中重新分类而来。第 10～14 属的病毒粒体为杆状，具有二分体或多分体基因组；其中一些最近也被重新分类。第 15～18 属的病毒具有等轴粒体。第 19 个属的病毒粒体为杆菌状。第 20 个属不能自我衣壳化。当可以获得更多的信息时，其中一些这样武断地并列在一起的属有可能归并于某个科。

* 根据最新的分类系统，其中的一些属被归列新成立的芜菁黄花叶病毒科与曲线病毒科中，见附录 2A——译者。

1. 烟草花叶病毒属（*Tobamovirus*）

该属的典型种为烟草花叶病毒（*Tobacco mosaic virus*，TMV）（Lewandowski and Dawson，1999）。正如第1章所描述的那样，TMV是人们所认识的第一种不同于细菌的、作为病原物的病毒，该病毒在植物病毒学的很多领域的进展中一直处于前沿。1999年，人们在不同会议和出版物上，庆祝该病毒发现100周年（Scholthof *et al.*，1999；*Proc. Roy. Soc. Lond. B* 特刊）。实际上，这导致了一个问题，即人们误认为TMV是最典型的植物病毒。

烟草花叶病毒属病毒的杆状粒体长为300～310 nm，直径为18 nm；粒体的细微结构已经了解清楚（参见第5章第Ⅲ节B）。病毒具有单一的正链ssRNA基因组，其大小为6.3～6.6 kb，病毒基因组组构将在第6章第Ⅷ节H.1详述。衣壳由多个拷贝的、分子质量为17～18 kDa的单一多肽组成。

烟草花叶病毒属病毒十分稳定，纯化的病毒制剂和病叶中的病毒的侵染性能保持50年以上。在自然中以机械摩擦方式传播（参见第12章第Ⅱ节F）。

2. 烟草脆裂病毒属（*Tobravirus*）

该属的典型种为烟草脆裂病毒（*Tobacco rattle virus*）（Visser *et al.*，1999）。烟草脆裂病毒属病毒具有杆状粒体，直径为20～22 nm，长度主要有两种：180～215 nm和46～115 nm。病毒基因组为正单链RNA，基因组分为两个片段（二分体），较长粒体内的RNA大小为6.8 kb，较短粒体内的RNA大小为1.8～4.5 kb（参见第6章第Ⅷ节H.2）。病毒衣壳由许多拷贝的、分子质量为22～24 kDa的单一蛋白质组成。

烟草脆裂病毒属病毒寄主范围广，能侵染单子叶植物和双子叶植物。自然传播介体为毛刺线虫（*Trichodorid nematode*）（参见第11章第Ⅺ节E）。有关PEBV的研究曾由Boulton（1996）综述。

3. 马铃薯X病毒属（*Potexvirus*）

该属的典型种为马铃薯X病毒（*Potato virus* X）（AbouHaidar and Gellatly，1999）。马铃薯X病毒属病毒的粒体为弯曲线状，直径为13 nm，长度为470～580 nm。病毒基因组为正单链RNA，大小为5.9～7.0 kb，病毒衣壳由一种大小为18～27 kDa的蛋白质亚基组成。基因组RNA的5′端有帽子结构，3′端有poly(A)尾。基因组组构见第6章第Ⅷ节H.3部分。

该属病毒以机械摩擦方式传播。

4. 香石竹潜隐病毒属（*Carlavirus*）

该属的典型种为香石竹潜隐病毒（*Carnation latent virus*，CLV）（Zavriev，1999）。该属病毒粒体为稍弯曲的线状，直径为12～15 nm，长度为610～700 nm。病毒基因组为线性的正单链RNA，大小为7.4～8.5 kb，3′端有poly(A)尾；该属一些成员的较短的粒体内包裹着亚基因组RNA。病毒衣壳由一种为分子质量为31～36 kDa的蛋白质亚基组成。该属病毒的基因组组构见第6章第Ⅷ节H.4部分。

该属的大多数病毒由蚜虫以非持久性方式传播。然而，CPMMV 由烟粉虱（*Bemisia tabaci*）传播。与 PeSV 和 RCVMV 一样，CPMMV 也可由种子传播。一些成员，如 CLV 和 PVS 在自然界通常由机械方式传播。

5. 葱 X 病毒属（*Allexivirus*）

该属的典型种为火葱 X 病毒（*Shallot virus* X）（Kanyuka *et al.*，1992）。该属病毒粒体为高度弯曲的线状，长为 800 nm，直径为 12 nm。病毒基因组为线性正单链 RNA，大小约为 9.0 kb，病毒衣壳由一种分子质量为 28～36 kDa 的蛋白质亚基组成。该属病毒的基因组构见第 6 章第Ⅷ节 H.5 部分。

该属成员寄主范围十分狭窄，在自然界由瘿螨传播。

6. 发样病毒属（*Capillovirus*）

该属的典型种为苹果茎沟病毒（*Apple stem grooving virus*，ASGV）（Salazar，1999）。该属成员具有弯曲细杆状粒体，直径为 12 nm，长为 640～700 nm；病毒基因组为线性正单链 RNA，大小为 6.5～7.4 kb；3′端有 poly(A)尾，病毒衣壳由一种分子质量为24～27 kDa的蛋白质亚基组成。该属病毒的基因组组构见第 6 章第Ⅷ节 H.6 部分。

尚未发现该属病毒的自然传播介体；ASGV 由种子传播。

7. 凹陷病毒属（*Foveavirus*）

该属的典型种为苹果茎痘病毒（*Apple stem pitting virus*）（Jelkmann，1994；Martelli and Jelkmann，1998）。该属成员具有弯曲线状粒体，直径为 12 nm，长为 800 nm；病毒基因组为线性正单链 RNA，大小为 8.4～9.3 kb，3′端有 poly(A)尾，病毒衣壳由一种分子质量为 28～44 kDa 的蛋白质亚基组成；该属病毒的基因组组构见第 6 章第Ⅷ节 H.7 部分。

该属成员的寄主范围仅限于一种或数种植物，尚未发现该属任何病毒的自然传播介体。

8. 纤毛病毒属（*Trichovirus*）

该属的典型种为苹果褪绿叶斑病毒（*Apple chlorotic leaf spot virus*）（German-Retana and Candresse，1999）。该属成员具有非常弯曲的线状粒体，直径为 12 nm，长为 640～760 nm；病毒基因组为线性正单链 RNA，大小约为 7.5 kb，3′端有 poly(A)尾，病毒衣壳由一种分子质量为 22～27 kDa 的蛋白质亚基组成；该属病毒的基因组组构见第 6 章第Ⅷ节 H.8 部分。

该属成员寄主范围相当窄。尚未发现该属病毒的自然传播介体，但有证据表明 GINV 可以在田间传播，PVT 可以在数种寄主上靠种子传播。

9. 葡萄病毒属（*Vitivirus*）

该属的典型种为葡萄 A 病毒（*Grapevine virus* A，GVA）（German-Retana and

Candresse，1999）。该属病毒的粒体为弯曲线状，直径为 12 nm，长为 725～825 nm。病毒基因组为一种线性正单链 RNA，大小为 7.6 kb，病毒衣壳由一种分子质量为 18～22 kDa 的蛋白质亚基组成。基因组 RNA 的 5′端有帽子结构，3′端有 poly(A)尾。该属病毒的基因组组构见第 6 章第Ⅷ节 H.9 部分。

该属成员的自然寄主范围仅局限于一种植物——葡萄，可能实验寄主范围较大些。GVA 和 GVB 由粉蚧（*Pseudococcus* 和 *Planococcus*）以半持久性方式传播，GVA 也可由介壳虫（*Neopulvinaria innumerabilis*）传播。HLV 在辅助病毒的作用下由蚜虫以半持久性方式传播。

10. 真菌传杆状病毒属（*Furovirus*）

该属的典型种为土传小麦花叶病毒（*Soil-borne wheat mosaic virus*，SBWMV）（Shirako and Wilson，1999）。该属病毒的粒体为弯曲线状，直径约为 20 nm，长为 260～300 nm 和 140～160 nm。病毒基因组为线性正单链 RNA，基因组分为两个片段，较长粒体内 RNA 大小为 6～7 kb，较短粒体内 RNA 大小为 3.5～3.6 kb。SBWMV 的较小病毒粒体内可能包含有缺失突变体。病毒衣壳由一种分子质量为 19～21 kDa 的蛋白质亚基组成。该属病毒的基因组组构见第 6 章第Ⅷ节 H. 10 部分。

正如该属的典型种的名称以及首字母缩写的属名（furo- = fungus-borne，rod-shaped）所示，该属病毒是经真菌传播的。SBWMV 由禾谷多黏菌（*Polymyxa graminis*）传播。

11. 花生丛簇病毒属（*Pecluvirus*）

该属的典型种为花生丛簇病毒（*Peanut clump virus*）（Reddy *et al.*，1999；Shirako and Wilson，1999）。该属病毒粒体为杆状，直径约为 21 nm，长为 245 nm 和 195 nm。病毒基因组为线性正单链 RNA，基因组分为两个片段，较长粒体内 RNA 大小为 5.9 kb，较短粒体内 RNA 大小为 4.5 kb。病毒衣壳由一种分子质量为 23 kDa 的蛋白质亚基组成；该属病毒的基因组组构见第 6 章第Ⅷ节 H. 11 部分。

该属病毒由禾谷多黏菌和种子（花生）传播。

12. 马铃薯帚顶病毒属（*Pomovirus*）

该属的典型种为马铃薯帚顶病毒（*Potato mop-top virus*，PMTV）（Torrance，1999；Shirako and Wilson，1999）。该属病毒的粒体为杆状，直径为 18～20 nm，三种长度分别为 290～310 nm、150～160 nm 和 65～80 nm。病毒基因组为线性正单链 RNA，基因组分为 3 个片段，RNA 分子大小分别为 6 kb、3～3.5 kb 和 2.5～3.0 kb。病毒衣壳由一种分子质量为 20 kDa 的蛋白质亚基组成；该属病毒的基因组组构见第 6 章第Ⅷ节 H. 12 部分。

该属病毒寄主范围较窄，迄今仅局限于双子叶植物。该属病毒在土壤中由真菌传播；已证明马铃薯粉痂菌（*Spongospora subterranea*）和甜菜多黏菌（*Polymyxa betae*）分别是 PMTV 和 BSBV 的传播介体。

13. 甜菜坏死黄脉病毒属（*Benyvirus*）

该属的典型种为甜菜坏死黄脉病毒（*Beet necrotic yellow vein virus*，BNYVV）（Tamada，1999）。该属病毒的粒体为杆状，直径为 20 nm，4 种主要的粒体长度分别为 390 nm、265 nm、100 nm 和 85 nm。病毒基因组为线性正单链 RNA，分为 4 个片段，大小分别为 6.7 kb、4.6 kb、1.8 kb 和 1.4 kb；BNYVV 的某些分离株还有第 5 个大小为 1.3 kb 的 RNA 分子。最大的两个 RNA 分子即构成了侵染性的基因组（infectious genome），其余 RNA 分子起辅助作用，影响传播以及症状表现（参见第 14 章第Ⅱ节 B.3.c）。这些 RNA 分子的 5′端有帽子结构，与其他杆状病毒不同的是，其 3′端有 poly(A)尾，病毒衣壳由一种分子质量为 21～23 kDa 的蛋白质亚基组成。该属病毒的基因组组构见第 6 章第Ⅷ节 H.13 部分。

该属的典型种 BNYVV 在许多甜菜种植区引起严重危害。BNYVV 与该属另一成员，BSBMV，均由甜菜多黏菌（*Polymyxa betae*）传播。

14. 大麦病毒属（*Hordeivirus*）

该属的典型种为大麦条纹花叶病毒（*Barley stripe mosaic virus*，BSMV）（Lawrence and Jackson，1999）。该属病毒的粒体为杆状，直径大约 20 nm，长度为 110～150 nm，病毒基因组为线性正单链 RNA，分为 3 个片段，α、β、γ；α 大小为 3.7～3.9 kb，β 大小为 3.1～3.6 kb，γ 大小为 2.6～3.2 kb；在特定病毒种的株系之间，α 和 β 大小相似，而 γ 大小有变化（参见第 6 章第Ⅷ节 H.14）。病毒衣壳由一种分子质量为 17～18 kDa 的蛋白质亚基组成。

该属病毒的自然传播介体尚不清楚，在田间传播据认为需要叶片的接触。BSMV 和 LRSV 可由种子高效传播，这就提供了病害的初侵染源。

15. 南方菜豆花叶病毒属（*Sobemovirus*）

该属的典型种为南方菜豆花叶病毒（*Southern bean mosaic virus*）（Sehgal；1999；Tamm and Truve，2000）。该属病毒粒体为等轴，$T=3$，直径约 30 nm，病毒衣壳由 180 个大小为 26～30 kDa 的一种蛋白质亚基组成。每个病毒粒体含有一个正单链 RNA 分子，大小为 4.1～4.5 kb，在其 5′端有一个 VPg；该属病毒的基因组组构见第 6 章第Ⅷ节 H.15 部分。

有几种该属的病毒是由种子传播的，而该属的大多数成员是由甲虫传播的，一种由盲蝽（mirid）传播（参见第 11 章第Ⅶ节 B）。

16. 玉米细条病毒属（*Marafivirus*）

该属病毒的典型种为玉米细条病毒（*Maize rayado fino virus*）。该属病毒的提纯制剂有两种组分，B 组分和 T 组分。B 组分包含有病毒基因组，而 T 组分不包含 RNA。等轴病毒粒体直径为 28～32 nm，病毒衣壳蛋白亚基为两种分子，主要蛋白质（major protein）亚基的分子质量为 21～22 kDa，而次要蛋白质（minor protein）亚基的分子质量为 24～28 kDa；病毒基因组大小为 6.5 kb，5′端有帽子结构，3′端有 poly(A)尾，同时胞苷（cyti-

dine）的含量较高。该属病毒的基因组组构见第 6 章第Ⅷ节 H. 16 部分。

该属病毒寄主范围窄，仅限于禾本科植物，由叶蝉传播，可能在其介体内复制。

17. 芜箐黄花叶病毒属（*Tymovirus*）

该属病毒的典型种为芜箐黄花叶病毒（*Turnip yellow mosaic virus*）（Gibbs，1999）。该属病毒等轴粒体的直径为 30 nm，$T=3$，病毒衣壳由 180 个大小为 20 kDa 的蛋白质亚基组成。通过电子显微镜术和离心沉淀可区别丰满的（B 组分）和空的（T 组分）两种病毒粒体。B 组分的丰满粒体包含有一个线性正单链 RNA 分子，大小为 6.3 kb，RNA 中的胞苷含量较高，与玉米细条病毒属病毒相似。该属病毒 RNA 的基因组组构在第 6 章第Ⅷ节 H. 17 部分介绍。病毒基因组 RNA 的复制与叶绿体边际的小泡（vesicle）有关（参见第 8 章第Ⅴ节 K. 2）。

芜箐黄花叶病毒属成员的寄主范围看来仅限于双子叶植物。由叶甲科（Chrysomelidae）和象甲科（Curculionidae）的甲虫传播。

18. 悬钩子病毒属（*Idaeovirus*）

该属病毒的典型种为悬钩子丛矮病毒（*Raspberry bushy dwarf virus*，RBDV）（Mayo and Jones，1999b）。该单种属的病毒粒体为等轴，直径约为 33 nm，病毒粒体内包含 3 种线性正单链 RNA，大小分别为 5.5 kb、2.2 kb 和 1 kb，两种较大的 RNA 分子组成病毒基因组（参见第 6 章第Ⅷ节 H. 18 部分的基因组组构）；最小的 RNA 为编码30 kDa外壳蛋白的亚基因组 mRNA。

RBDV 的自然寄主范围仅限于悬钩子属（*Rubus*）植物。该病毒可经种子垂直传播和经花粉横向传播。

19. 欧尔密病毒属（*Ourmiavirus*）

该属病毒的典型种为欧尔密甜瓜病毒（*Ourmia melon virus*）（Accotto *et al.*，1997）。该属病毒粒体为杆菌状，直径为 18 nm，长度为 62 nm、46 nm、37 nm 和 30 nm；粒体的末端为圆锥体（半二十面体）。病毒基因组为线性正单链 RNA，分为 3 个片段，大小分别约 2.9 kb、1.1 kb 和 1.0 kb（经凝胶电泳确定的分子质量估计的核酸长度）。病毒衣壳由多个拷贝的、分子质量为 25 kDa 的一种蛋白质亚基组成。自然传毒介体尚不清楚。

20. 幽影病毒属（*Umbravirus*）

该属病毒的典型种为胡萝卜斑驳病毒（*Carrot mottle virus*）（Robinson and Murant，1999）。该属病毒自身不编码普通的外壳蛋白，其自然传播时的粒体是通过与辅助病毒相联系而形成的，辅助病毒多为黄症病毒科成员，它们提供外壳蛋白。然而，没有外壳的幽影病毒 RNA 却非常稳定。该属病毒由机械方式传播，但其对有机溶剂的敏感性表明其 RNA 分子可能由脂膜包裹着。

幽影病毒基因组为线性正单链 RNA，大小约为 4 kb，其基因组组构将在第 6 章第Ⅷ节 H. 20 部分介绍。

该属病毒寄主范围非常窄，如上所述，其自然传播是经蚜虫与辅助病毒一起进行的。

第Ⅳ节　反转录因子

反转录因子（retroelement）分为病毒反转录因子、真核染色体内的非病毒反转录因子以及细菌染色体的反转录因子（Hull and Covey，1996）。植物病毒反转录因子归类于花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*），均为复制循环不涉及整合阶段的副反转录病毒。植物基因组（以及其他界生物的基因组）包含多种反转录因子，这些因子在基因组组构和复制循环方面都与整合性的动物反转录病毒（retrovirus）相似，但迄今尚未发现其导致侵染的情况。这些因子称为反转录转座子（retrotransposon）。反转录转座子在结构上有长末端重复序列（long terminal repeat，LTR），该序列是整合到寄主基因组所必需的。除了基本的 RNA→DNA→RNA 复制外，这些因子还有一些其他方面的共同特点。活化的反转录因子的酶复合体包含反转录酶（RT）、核糖核酸酶 H（RNaseH）和一个核酸结合蛋白（nucleic acid-binding protein）。该蛋白质在反转录病毒中称为 gag，而在副反转录病毒中为衣壳蛋白（Mason *et al.*，1987）。这些因子也编码天冬氨酸蛋白酶和整合酶（integrase，int）。对于这些形成病毒样颗粒（virus-like particle）的反转录转座子，ICTV 最近又提出并批准了两个新的科：伪病毒科（*Pseudoviridae*）和转座病毒科（*Metaviridae*）（van Regenmortel *et al.*，2000）。

A. 伪病毒科

该科包括一些形成等轴的病毒样颗粒的反转录转座子，这些病毒样颗粒带有能够进行类似反转录病毒复制循环的线性正单链 RNA（ssRNA），构成了许多真核物种特别是植物基因组内在的，而且重要的一部分。多数情况下植物基因组包含许多这些反转录因子整合的拷贝，但却是发生变异的缺陷形式，不能够进行复制。这些病毒粒体在复制循环中起着很重要的作用，但无侵染性，也不能进行水平传播。

1. 伪病毒属（*Pseudovirus*）

该属的代表种为酿酒酵母 Ty1 病毒（*Saccharomyces cerevisiae* Ty1 *virus*）。该属成员的粒体直径为 40～60 nm，结构不均一，有些呈二十面体对称结构。病毒粒体包含一个 5.6 kb 大小的 RNA，有两个可读框（ORF）。5′ ORF 编码衣壳蛋白（gag），3′ ORF 编码的蛋白质（pol）有天冬氨酸蛋白酶、整合酶和反转录酶。两个 ORF 都是基因组 RNA 表达的，3′ ORF 由 5′ ORF 的 C 端移码产生（参见第 7 章第Ⅴ节 B. 10）。

在高等植物中已发现许多伪病毒属病毒，在低等植物如酵母（真菌）中也发现了一些该属病毒。

2. 半病毒属（*Hemivirus*）

该属的代表种为果蝇 copia 病毒（*Drosophila melanogaster copia virus*）。该属成员病毒粒体为等轴状，结构不详。基因组大小为 5.1 kb，含有一个 ORF，编码 gag 和

pol，通过剪接编码 gag 的 mRNA 来调控表达。尽管该属病毒与伪病毒属和花椰菜花叶病毒科成员相似，即利用起始子（initiator）甲硫氨酸 tRNA 作为引物从基因组 RNA 起始合成负链 DNA，但与其他病毒（因子）不同的是，它们通过切割反密码子环（anticodon loop）只利用半个 tRNA 分子作为引物。

在高等植物中尚未发现该属病毒，在酵母中也仅有一例。

B. 转座病毒科（*Metaviridae*）

该科成员病毒粒体的形态研究很少，粒子大小不一。这些粒子通常称为病毒样颗粒（virus-like particle，VLP）。

1. 转座病毒属（*Metavirus*）

该属的代表种为酿酒酵母 Ty3 病毒（*Saccharomyces cerevisiae Ty3 virus*）。转座病毒属的 VLP 通常呈球状，直径约 50 nm，包含一个大小约 5 kb 的、带有多聚腺苷酸[poly(A)]的 RNA 分子。酿酒酵母 Ty3 病毒的基因组与伪病毒属病毒相似，有两个 ORF，但 *pol* ORF 中功能结构域（蛋白酶、反转录酶和整合酶）排列次序不同。

该属包括来自高等植物的一些病毒，如湖北百合 del1 病毒（*Lilium henryi del1 virus*），以及酵母菌和其他真菌的病毒。

2. 游移病毒属（*Errantivirus*）

该属的代表种为果蝇 gypsy 病毒（*Drosophila melanogaster gypsy virus*）。该属成员病毒粒体不规则，直径约 100 nm，包含一条大小约 7.5 kb 的 RNA 分子。基因组有 3 个 ORF，其中 5′ORF 编码 *gag* 基因，*pol* ORF 编码功能结构域（蛋白酶、反转录酶和整合酶），其排列次序与伪病毒科不同，另外还有一个 *env* ORF。*pol* ORF 是由 *gag* ORF 移码产生的，而 *env* ORF 的产生是通过 mRNA 的剪接而完成的。在高等植物和低等植物中还未发现游移病毒属病毒。

第Ⅴ节　低等植物的病毒

A. 藻类的病毒

已发现有两类病毒可以侵染藻类（algae）：归类为藻类 DNA 病毒科（*Phycodnaviridae*）的大型病毒，以及形态上与 TMV 相似的一种病毒。此外，还有一些尚未鉴定的病毒。

1. 大型藻类病毒（van Etten，1999；van Etten and Meints，1999）

在许多属于绿藻纲（Chlorophyceae）、红藻纲（Rhodophyceae）与褐藻纲（Phaeophyceae）的真核藻类（eukaryotic algae）的超薄切片中已发现病毒样颗粒，这些粒子呈多角形，直径为 22～390 nm；有些藻类病毒还具有类似噬菌体的尾部。研究最多的是侵染小球藻样（Chlorella-like）绿藻的病毒。该组成员在生化特性上有很大差异

(van Etten *et al.*, 1988)。van Etten (1983) 用一种称为小球藻病毒 1 号 (*Paramecium bursaria chlorella virus* 1, PBCV-1) 的病毒侵染可培养的小球藻样藻类，从而发明了一种很重要的技术——空斑测定法 (plaque assay)。因此，现在对该病毒的大多数特性已有所了解。

PBCV-1 病毒粒体为二十面体结构，多层外壳包裹电子致密的 (electron-dense) 核心。外层衣壳由 1692 个壳粒 (capsomere) 按照 $T=169$、倾斜的二十面体晶格 (lattice) 方式排列；一些粒体的顶点伸展出发夹样的纤维。PBCV-1 的基因组全长为 330 kb的 dsDNA，具有共价闭合的发夹状末端结构。它包含 701 个可能的 ORF，其中 367 个主要的重叠的 ORF 编码蛋白质，325 个次要的 ORF 有可能编码或者不编码蛋白质。编码的蛋白质包括复制酶类 (如 DNA 聚合酶、DNA 连接酶和内切核酸酶)，核苷酸代谢酶类 [如腺苷三磷酸酶 (ATPase)、硫氧还蛋白 (thioredoxin) 与核糖核酸酶还原酶 (ribonuclease reductase)]，转录因子 (如 RNA 转录因子 TFIIB、TFIIS 以及 RNase Ⅲ)，蛋白质合成过程的酶类，修饰和降解的酶类 [如泛蛋白 (ubiquitin) C 端水解酶、翻译延伸因子 3 (translation elongation factor 3) 和 26S 蛋白酶亚基]，磷酸化酶，细胞壁降解的酶类，DNA 限制及修饰酶类，糖和脂类的加工酶类和各种不同的结构蛋白。

在海洋藻类中也发现了类似的大型 DNA 病毒 (van Etten and Meints, 1999)。

2. 小型藻类病毒

Skotnicki 等 (1976b) 描述了一种侵染真核生物藻类——轮藻 (*Chara australis*) 的病毒。该病毒 (CAV) 粒子呈杆状，其他特征与烟草花叶病毒属病毒 (tobamoviruses) 相似。但这种病毒的基因组更大一些 (为 11 kb，TMV 的基因组大小为 6.4 kb)，基因组中约有 7 kb 已测序，显示了与其他病毒的相关性 (Matthews, 1991)：①CAV 衣壳蛋白的组分与 BNYVV 和 TRV 的接近程度高于 TMV；②CAV 的 GDD 聚合酶模体与 BNYVV 接近；③在 CAV 中发现的两个 GKT 核苷酸结合模体 (nucleotide-binding motif) 的排列方式与马铃薯 X 病毒属病毒 (potexviruses) 的相近。因此，CAV 的基因组组构与序列似乎与侵染被子植物的数个组群的杆状病毒有共同特征。CAV 还与真菌传杆状病毒属 (*Furovirus*) 成员有密切关系，尚未发现被子植物寄主。因此，CAV 不太可能起源于一些从被子植物寄主转到轮藻属寄主的杆状病毒。

从形态学上讲，轮藻属是轮藻纲 (Charophyceae) 中最复杂的类型之一，它是一个归类明确且有一段悠久的地质学* 历史的类群 (Round, 1984)。基于在细胞学与化学方面的相似性，陆地植物 (有胚植物) 被认为是从轮藻纲的绿色藻类进化而来的。鞘毛藻属 (*Coleochaete*) ——轮藻纲中的另一个复杂类型，现已证实含有木质素 (lignin)，该物质曾被认为是绿藻中所没有的 (Delwiche *et al.*, 1989)。有分子遗传学证据支持陆地植物起源于轮藻的学说。在检测的所有陆地植物叶绿体 DNA 的 $tRNA^{ala}$ 和 $tRNA^{ile}$ 基因中发现了第二类内含子 (group Ⅱ intron)；在检测的所有藻类和真细菌 (eubacterium) 中都有

* 原文有误，为地理学——译者。

连续的基因。Manhart 和 Palmer（1990）提出在轮藻纲的 3 个成员中都有内含子存在，其排列方式与地钱属（*Marchantia*）的相同，这为陆地植物起源于轮藻纲提供了很好的证据。进化树的构建揭示轮藻纲可能在 4 亿～5 亿年前就已获得内含子。因而，在轮藻中发现的病毒很可能是侵染一种与被子植物的祖先有近缘关系的植物的病毒的最早记录。

现已发现新西兰的一种褐藻（*Eklonia radiata*）枯梢（dieback）症状与直杆状的（约 280 nm）和弯曲状的（700～900 nm）的病毒粒体有关（Easton *et al.*，1997）。

B. 真菌病毒

5 个病毒科的成员可侵染真菌（不包括酵母菌）。在水生真菌 *Rhizidiomyces* 中发现的病毒粒体为等轴球状，直径为 60 nm，包含一个 16.8 kb 的 dsDNA（Dawe and Kuhn，1983）。该病毒属于根前毛菌病毒属（*Rhizidiovirus*）（Dawe and Kuhn，1983）成员，以一种潜隐状态靠真菌的游动孢子传播，在逆境（stress）条件下受到活化。

如表 4.1 所示，大多数真菌病毒都是 dsRNA 基因组，这些病毒能够影响植物病原真菌的生物学（McCabe and van Alfen，1999）。多数情况下这些病毒是隐潜的（cryptic），但有些会诱导真菌如玉米普通黑粉菌（*Ustilago maydis*）产生杀伤性毒素，其他的会降低真菌的致病力（virulence）。

真菌的 dsRNA 病毒存在于 3 个科中。低毒病毒科（*Hypoviridae*）的成员有多型性、小泡状的粒体，直径为 50～80 nm，包含一个长为 9～13 kb 的 dsRNA（Nuss，1999）。编码区可分为两个 ORF 或者依种的不同作为一个 ORF 表达，低毒病毒属病毒（hypoviruses）侵染导致板栗疫的真菌（*Cryphonectria parasitica*），可降低其对栗树的致病力。双分病毒科（*Partitiviridae*）中有两个属侵染真菌（Ghabrial and Hillman，1999）。与侵染植物的双分病毒属成员（partitiviruses）相似（参见第Ⅲ节 E 部分），病毒粒体为等轴球状，直径 30～40 nm，包含两段 dsRNA。大片段编码病毒的聚合酶，小片段编码衣壳蛋白。这些病毒与真菌的潜伏侵染相关。全病毒科（*Totiviridae*）全病毒属（*Totivirus*）的成员为等轴球状粒体，直径为 40 nm，衣壳内包着一条单分子 dsRNA（4.6～6.7 kb）（Ghabrial and Patterson，1999），这些病毒影响真菌对寄主的潜伏感染。

侵染真菌的（+）ssRNA 病毒的一个科，杆状 RNA 病毒科（*Barnaviridae*），病毒粒体为杆状，宽 18～20 nm，长 48～53 nm（Romaine，1999）。病毒粒体包含一条 4 kb的单链 RNA 分子，5′端带有一个 VPg（Revill *et al.*，1998），3′端无 poly（A）尾。基因组有 4 个主要的 ORF（Revill *et al.*，1994）。基因组排列与马铃薯卷叶病毒属病毒（poleroviruses）相似（参见第Ⅲ节 P.2），ORF 1 的功能未知；ORF 2 和 ORF3 编码病毒的聚合酶类，包括蛋白酶、VPg 和 RdRp 结构域；ORF 4 编码的 22 kDa 衣壳蛋白是由亚基因组表达的（Revell *et al.*，1999）。该属中的一个种，蘑菇杆状病毒（*Mushroom bacilliform virus*）侵染蘑菇（*Agaricus bisporus*）和地蘑菇（*A. campestris*）。这很可能与栽培蘑菇的法兰西病（La France disease）相关。

C. 蕨类植物病毒

迄今尚无有关苔藓植物（bryophyte）病毒的报道。Hull（1968）在荷叶蕨（*Phyllitis scolopendrium*）中发现了一种与烟草脆裂病毒相似的病毒粒体。

D. 裸子植物病毒

苏铁（*Cycas revoluta*）的一种病害已证明是由一种病毒导致的，依该病毒为二分基因组及其他特征将其归类于线虫传多面体病毒属（*Nepovirus*）（Hanada *et al.*，1986）。该病毒很容易通过机械接种传播给不同的藜属植物，也能通过种子传播。有一些报道表明松树能通过人工接种的方法受被子植物病毒侵染（Fulton，1969；Jacobi *et al.*，1992）。也有一些在其他裸子植物上自然发生的病毒样病害的报道，但未证明该病害确实由病毒所致（Schmelzer *et al.*，1966）。然而，由于丹宁酸等物质的存在，试图从裸子植物中分离病毒从技术上讲是有困难的。

E. 小结

侵染轮藻属的正链 RNA 病毒的存在揭示了这种类型病毒起源于古代。除此以外，我们对那些能够侵染比被子植物低等的进行光合作用的真核生物的病毒信息知之甚少。因而我们很难明确植物病毒进化的年代和进程。自从中生代早期以来的记载中，苏铁类植物被认为是活化石。然而，在苏铁中发现的线虫传多面体病毒很可能来源于一种现代被子植物，因为它很容易侵染各种藜属植物。侵染一种小球藻样绿藻的藻类 DNA 病毒 PBCV-1 更有可能起源于古代。然而，从结构上看它们似乎不是原始的病毒，比任何已知的侵染被子植物的病毒大得多，也更为复杂，其基因组大小约为 300 kb，并具有至少 50 种结构蛋白（Meints *et al.*，1986）。

第Ⅵ节 讨论

正如本章引言中提到的，病毒的分类系统虽然完全合理，但没有自然基础，主要是因为在进化上没有时间相关的信息及病毒种与属间的关系。因而人们不能够明确地区分趋同进化（convergent evolution）和趋异进化（divergent evolution）。有关病毒进化的进一步讨论见本书第 17 章。

尽管有一定的局限性，在过去的 20 年左右时间已建立起一套有效的植物病毒分类系统。这个系统的发展已经引起了一些争议，然而，毋庸置疑，将来还会有其他的争议（Bos，1999；Pringle 1999b；van Regenmortel 1999；Bos，2000；van Regenmortel，2000）。这个系统大部分符合第Ⅰ节 A 部分中提出的 4 项标准，但是，如前所述，在进化的关系上还有一些限制。该系统是动态的，会因为新的研究成果的引用而修正和改进。目前正在不断地建立新的病毒属，并将一些有共同特征的属归到相应的科中。例如，把黄症病毒属重新划分为 3 个病毒属，归为一个科（参见第Ⅱ节 C），这对于了解这些病毒有重要意义。其他病毒组也正要或可能要进行合并。例如，苜蓿花叶病毒（AMV）越来越表现出与等轴不稳环斑病毒属成员（ilarviruses）有许多共同特征（参见第Ⅲ节 J. 3），因而正出现一些要将苜蓿花叶病毒属（*Alfamovirus*）与等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）合并的观点。然而，这两个属一旦合并我们应该注意到两个组群的病毒在粒体结构上的差异。需要进一步考虑的是如何将 20 个正链 ssRNA 病毒悬浮属进一步归类。在 Q 部分中已将有共同特征的属集中在一起，强调了建立新的分类单位的

可能性。

随着报道的逐渐增多，已开始出现建立更高一级分类单位的压力。在第Ⅰ节C部分中已提及在复制过程中包含反转录阶段的病毒（或其他因子）。这会将侵染不同界别的尤其是真核生物的病毒归类在一起。当然，已有一些组群如呼肠病毒科（*Reoviridae*）和弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）就横跨动物和植物两界。现在需要建立一个能反映正义ssRNA基因组病毒共性的系统。正如将在第7章和第8章中进一步探讨的那样，病毒在侵染其寄主的过程中要面临和克服各种困难和问题，现在已发现侵染植物与动物的病毒有一些共同的、相应的解决办法。这些研究进展应当在分类中体现出来。

Mayo和Brunt（2001）综述了植物病毒分类的现状。

第3章　症状和寄主范围

只有当病毒引起植物的生长严重异常时，其经济重要性才得以体现。对于实验研究而言，我们通常是根据病毒所引发的症状来证明其生物学活性。在早期的病毒研究中，尤其是在病毒的分离和特征描述之前，症状学显得尤为重要。依据病害的症状进行鉴定和分类会引起很多混乱，这是因为多种因素会对病毒所致的症状产生显著影响，而这一点在当时尚未得到普遍认识（参见第10章）。

大多数病毒是以其在主要寄主或被首先描述的寄主上的重要症状来命名的。许多文献都对病毒所引发的病害做了描述。这些文献 Smith（1937，1972）、Bos（1978）和 Holmes（1964）曾经做过总结，1970年以来由 B. D. Harrison 和 A. F. Murant 编辑、CMI/AAB 出版的《植物病毒志》（*Descriptions of Plant Viruses*）也包括了这些文献，现已由应用生物学家协会（AAB）汇编于 CD-ROM 光盘上（附录3）。一些病毒在适当的条件下可以侵染植物而不产生任何明显的症状，也有些病毒可使整株植物迅速死亡。在这两种极端情况之间，植物病毒可引发植物表现多种症状。

病毒侵染植物以后，并非在所有阶段使受侵染植物的各个部位都表现症状。病害不显著的6种情况为：①植物受一个很弱的病毒株系侵染；②寄主耐病；③ 新形成的叶片带毒但不显症；④ 叶龄和叶位使得叶片未被感染；⑤ 花叶图式中的深绿色区域（参见第10章第Ⅲ节O.4）；⑥ 植物被隐潜（cryptic）病毒侵染（参见第2章 第Ⅲ节E）。

第Ⅰ节　植物病毒引起的经济损失

对植物病毒进行深入研究的主要动力之一是病毒病害对全球作物产量的影响（Waterworth and Hadidi，1998），虽然我们很难获得其造成实际损失的准确数据。真菌和细菌病原造成损失的记载较为详细，我们经常可以查阅到特定真菌和细菌病原损失估计的记载。在这些资料中，病毒所造成的损失常被归类为诸如“病毒病害”、“所有其他的”或“混杂的”病害范畴。然而，病毒所造成的经济损失比我们所认识的严重得多。一些因子，尤其是病毒侵染的隐潜性，决定了我们对病毒危害认识的不足。病毒病害没有其他病原造成的病害明显，而且病毒病害持续的时间更长，这一点在多年生和无性繁殖作物上尤为突出。

评估病毒病害全球的损失所引发的一个深层次的问题是：大多数据主要来自于小范围的比较试验而非源于大规模的全面调查，而且不能根据小范围的损失数据来推测全球的损失估计值。其原因主要有：①特定作物上由特定病毒造成的损失会逐年发生变化；②不同地理区域和气候区域之间的差异；③损失估计方法学的不同；④ 引发病害的病毒病原学的鉴定；⑤ 对“损失”这一术语定义的不同；⑥ 与引起损失的其他因素的复杂化。

即便如此，一些文献对于解决这些问题还是具有指导意义的，其中包括 FAO 建立

的损失估计方法（Chiarappa，1971）、作物损失评估的基本原理和概念以及用于作物生长和产量损失估计的模型的建立（Teng，1987）。相关的文献及论述还包括：作物损失的本质（Main，1983）、损失的确认与评估（McKenzie，1983）、作物损失的分级（Main，1977）、植物病害及其损失的评估（James，1974）、损失的确定方法（Bos，1982）、作物损失的术语与概念（Nutter *et al.*，1993）。

除了产量损失和品质下降等危害之外，病毒侵染通常不会引发明显的病害。但是病毒可以通过多种细微的方式对植物产生影响，由表 3.1 列举了一些病毒对植物造成损失的方式，从中可以看出：病毒侵染对作物的影响要远远超出产量和品质下降的范畴，而损失估计并未考虑到这些间接的因素。

表 3.1　与植物病毒侵染相关的一些直接或间接的损害类型

生长减缓	
	- 产量降低（包括隐症侵染）
	- 颗粒无收
生长势减弱	
	- 对霜冻和干旱的敏感性增加
	- 更易受其他病原物和害虫的侵袭
品质和市场价值降低	
	- 影响视觉吸引力的瑕疵：大小、形状、色泽
	- 降低了保存的品质
	- 对消费者的吸引力降低：等级、口感、质地、成分
	- 繁殖的适合度降低
保持作物健壮的成本	
	- 田园卫生，包括介体的控制
	- 无病毒繁育材料的生产
	- 繁殖材料和进出口商品的检验（植物检疫措施）
	- 根除措施
	- 抗病育种
研究、推广和教育	

经允许，引自 Waterworth 和 Hadidi（1998）。

虽然存在诸多限制因素，但是我们还是收集到了多组有关损失的数据（Hull and Davies，1992；Waterworth and Hadidi，1998）。表 3.2 就此提供了一些实例。

表 3.2　病毒导致作物损失的一些实例

作物	病毒	国家	年损失[b]
水稻	水稻东格鲁病毒	东南亚	$\$1.5\times10^9$
	水稻齿叶矮缩病毒	东南亚	$\$1.4\times10^8$
	水稻白叶病毒	中南美洲	$\$9.0\times10^6$

续表

作物	病毒	国家	年损失[b]
大麦	大麦黄矮病毒	英国	£6×10^6
小麦	大麦黄矮病毒	英国	£5×10^6
	马铃薯卷叶病毒	英国	£$3\times10^7 \sim 5 \times 10^7$
马铃薯	马铃薯Y病毒		
	马铃薯X病毒		
甜菜	甜菜黄化病毒	英国	£$5\times10^6 \sim 50 \times 10^6$
	甜菜轻型黄化病毒		
柑橘	柑橘速衰病毒	全球	£$9\times10^6 \sim 24 \times 10^6$
木薯	非洲木薯花叶病毒	非洲	\$$2\times10^9$
多种作物	番茄斑萎病毒[a]	全球	\$$1\times10^9$
可可	可可肿枝病毒	加纳	1.9×10^8棵树[c]

注：a. 经允许，引自 Prins 和 Goldbach (1998)；其他数据的参考文献见 Hull 和 Davies (1992)。b. 货币符号：$，美元；£，英镑。c. 近40年砍伐的树木的总数。

第Ⅱ节　宏观症状

A. 局部症状

叶片上病毒侵入点附近产生的局部斑通常不会导致严重的经济损失，但其对于生物测定却十分重要（参见第12章）。受侵染的细胞可能失去叶绿素和其他色素，形成褪绿的局部斑（彩色图版3.1）。枯斑可能为白色，或者仅比叶片上其他部位的绿色稍浅。在有些病害中，如接种TBSV的老叶，枯斑中的叶绿素含量要高于周围组织。对多个寄主和病毒组合而言，受侵染的细胞死亡后会形成坏死斑。坏死斑的大小相差很大，有些为小的坏死斑点，而有些则为大的、不规则扩展的坏死区（彩色图版3.2）。第三类坏死斑是环斑，典型的环斑由中央的一群死亡的细胞组成。此外，环斑会发展为由一个或多个由死细胞组成的表面同心环，环间为正常的绿色组织（彩色图版3.3）。有些环斑型的局部斑由褪绿环而非坏死环组成。有些病毒感染特定寄主后，在完整叶片上产生的局部斑并不明显，但是叶片经乙醇脱色和碘染色处理之后，可以观察到明显的“局部淀粉斑”。

对于通过机械接种形成局部斑的病毒，若改用其他接种方式则有可能不产生局部斑。例如，BYV在头状藜（*Chenopodium capitatum*）上产生局部坏死斑，但是病毒经由桃蚜（*Myzus persicae*）在薄壁组织细胞取食而引入后便不再形成坏死斑（Bennett，1960）。相反，AMV经蚜虫传播后可诱发植物产生局部斑。

B. 系统症状

下述部分对病毒系统侵染所产生的主要症状类型进行了总结。在某些特定的病害

中，各种症状通常会协同出现，这一点应该注意。对于一个特定的寄主-病毒组合而言，病害的产生通常是不同症状类型的一个连续的发展过程。

1．对植株体积的影响

植株体积的减少是病毒侵染所产生的最为常见的症状（彩色图版3.4）。植株受到系统侵染（如“潜伏侵染”）后可能只表现轻微的整体矮化，但没有明显的发病迹象。例如，大田马铃薯被PVX的和性株系侵染后，不表现明显的症状。病毒危害的判定需要精心设计的实验得以进行，通过实验证明PVX可使马铃薯块茎的产量减少7%～15%（Matthews，1949d）。通常，植株的矮化程度与其他症状的严重度有关，叶片中叶绿素的损失尤其容易导致植株矮化。一般来讲，植株的矮化基本上可完全归因于叶片的尺寸和节间长度的减小，而叶片的数量很少受到影响。

多年生落叶植物（如葡萄）受到病毒侵然后，春季生长的起始可能延缓（Gilmer *et al.*，1970）。从病毒侵染的菊花上取下切断，切断根部的起始生长会变得缓慢（Horst *et al.*，1977）。

对于无性繁殖的植物而言，矮化通常是一种累计效应。例如，病毒感染的草莓植株和郁金香鳞茎会逐年变小。

矮化对植株各部分的影响几乎是均等的，包括叶片、花、果实和根的尺寸的减少，以及叶柄和节间的缩短。植株的有些部位可能比其他部位更为矮小，例如，小樱桃受到病毒侵染后，尽管叶片生长得很茂盛，但果实会因细胞分裂的减少而变小。果实总产量的减少是病毒病害的一个普遍特征，同时也是经济损失的重要方面。产量降低有时是由于果实变小和数量的减少造成的（Hampton，1975）。有些病害如李矮缩，发病植株的果实数量骤减，但尺寸反而要大于正常的果实。受李矮缩病毒（Way and Gilmer，1963）或李坏死环斑病毒（Vértesy and Nyéki，1974）侵染的樱桃树传粉给健康植株后，结实率会降低。受侵染植株的种子比正常种子小，萌发率低，不育种子的比例增加（Walkey *et al.*，1985）。

2．花叶图式（pattern）及相关症状

叶片上出现由浅绿和深绿区域形成的花叶症状，这是病毒侵染的最为明显的特征之一。在本节中，我们会对此加以描述，同时还会在第10章第3节中P部分讨论当前关于花叶症状形成的分子机制。

不同病毒-寄主的组合中，花叶症状的本质也存在很大差异。就双子叶植物来说，构成花叶的区域在轮廓上通常是不规则的。花叶部位可能仅由两种色度（深绿和浅绿或黄绿色）组成，这种情形在TMV感染的烟草上较为常见（彩色图版3.5）。有些花叶是由多种不同色度的黄色和绿色构成，如被TYMV感染的中国大白菜（彩色图版3.6）。不同颜色区域的交汇处可能比较明显，这类病害和叶绿体中的遗传缺损所导致的花叶非常相似，AbMV是这一类型中一个很好的例子（彩色图版3.7）。TYMV在中国大白菜上产生花叶症状的清晰度接近于可遗传的色斑。深色和浅色区域的边界可能会比较模糊（彩色图版3.8）。如果浅色与深色区域仅存在细微的差异，那么就很难观察斑驳症状，PVX的一些和性株系感染的马铃薯就存在这种情形。在感染花叶病的草本植

物上，系统症状是以一个相当明确的顺序发展的。病毒自接种叶向上移动至正在生长的枝条和部分伸展的叶片之中。在这些叶片中，初期症状为“明脉”（vein-clearing）或黄脉，如第10章（第Ⅲ节O.2）所述，这种症状可能只是光学幻觉（视错觉）。然而，褪绿镶脉（vein-banding）却是一类真实的症状，但是有时可能非常模糊，也有时叶脉会显得十分突出（彩色图版3.9）。镶脉是病毒病害的主要特征之一。

叶片在伸展阶段（细胞分裂期，此时烟草和大白菜的叶片长4～6 cm）后受到侵染时，基本不表现花叶症状，颜色比正常叶片均一地变浅。在表现花叶症状的老叶上，通常会在浅色背景中出现许多小的深色的绿岛组织。花叶区域一般局限于叶片上最幼嫩的部位，即基部和中央部分。虽然不同植物当中存在着相当大的差异，一般来讲，但是随后受到系统侵染的幼叶一般都会出现由大小不等的区域所构成的花叶。除了整体伸展阶段（叶片的大部分生长过程基本都处于此阶段）之外，在叶片发育早期形成的花叶症状通常不会发生变化。在一些花叶病中，深绿部位主要集中在叶脉附近，从而表现为深绿色的镶脉类型。

单子叶植物受到病毒侵染后，叶片上通常会出现条纹或条斑，颜色比叶片上其他部位稍浅。条纹的色度变化很大，有浅绿色、黄色或白色，有尖角的条纹基本与叶片纵向平行（见彩色图版3.10）。

单子叶植物上发生的条纹病害，其发展与双子叶植物上的花叶症状十分相似。接种叶上方的叶片在接种时如果正处于伸展阶段，这些叶片上不出现条纹症状。在第一个出现条纹的叶片上，症状比较清晰且仅发生在叶片的基部（幼嫩部分）。嫩叶上产生的条纹很大且遍布整个叶片。叶片发育早期出现的条纹，其扩展则会受到抑制，而且这种情形在叶片生长的多数时间内保持不变。随着叶片的老化，黄化部位则会出现坏死。

花瓣上的色斑或“碎色”（color-breaking）通常伴随着叶片上的花叶或条纹症状发生。碎色一般由色斑、条纹或者颜色上有别于正常组织的部分构成（见彩色图版3.11和图版3.12）。花瓣碎色是因为缺少花青素所致，而花青素与色原体的着色有关。以郁金香增色病毒（tulip color-adding virus）为例，其侵染可导致细胞中某些区域的色素沉积增加。花瓣中的蜜腺标记对人是非可见的（对蜜蜂是可见的），这是因为它们含有仅在紫外光区强烈吸收的色素（Thompson *et al.*，1972）。病毒的侵染对蜜腺标记以及蜜蜂行为的影响尚未进行研究。

受病毒感染的花通常比正常花小，而且可能会过早地脱落。花“碎色”有时可能会与遗传着色混淆，但是出现花叶症状是病毒侵染的一个很好的诊断特征。有时，因病毒侵染而产生彩斑的植物可能极具商业价值。正如第1章第Ⅰ节所述，曾经被病毒感染的郁金香一度被珍视为奇特的品种。随着花叶症的发展，那些受病毒侵染时小于特定尺寸的花上才会出现花瓣碎色。因此，在郁金香开花前11天以内接种TBV，即使花瓣中存在病毒也不会出现碎色症（Yamaguchi and Hirai，1967）。病毒的侵染会减少花粉的形成、降低结实率，并导致种子变小和萌发率降低（Hemmati and McLean，1977）（图3.1）。

表现花叶病的植物形成的果实可能出现斑驳，如感染CMV的小西葫芦（见彩色图版3.13）。其他病害中还可能出现严重的矮化和果实畸形。感染病毒种子的种皮可能出现杂色。

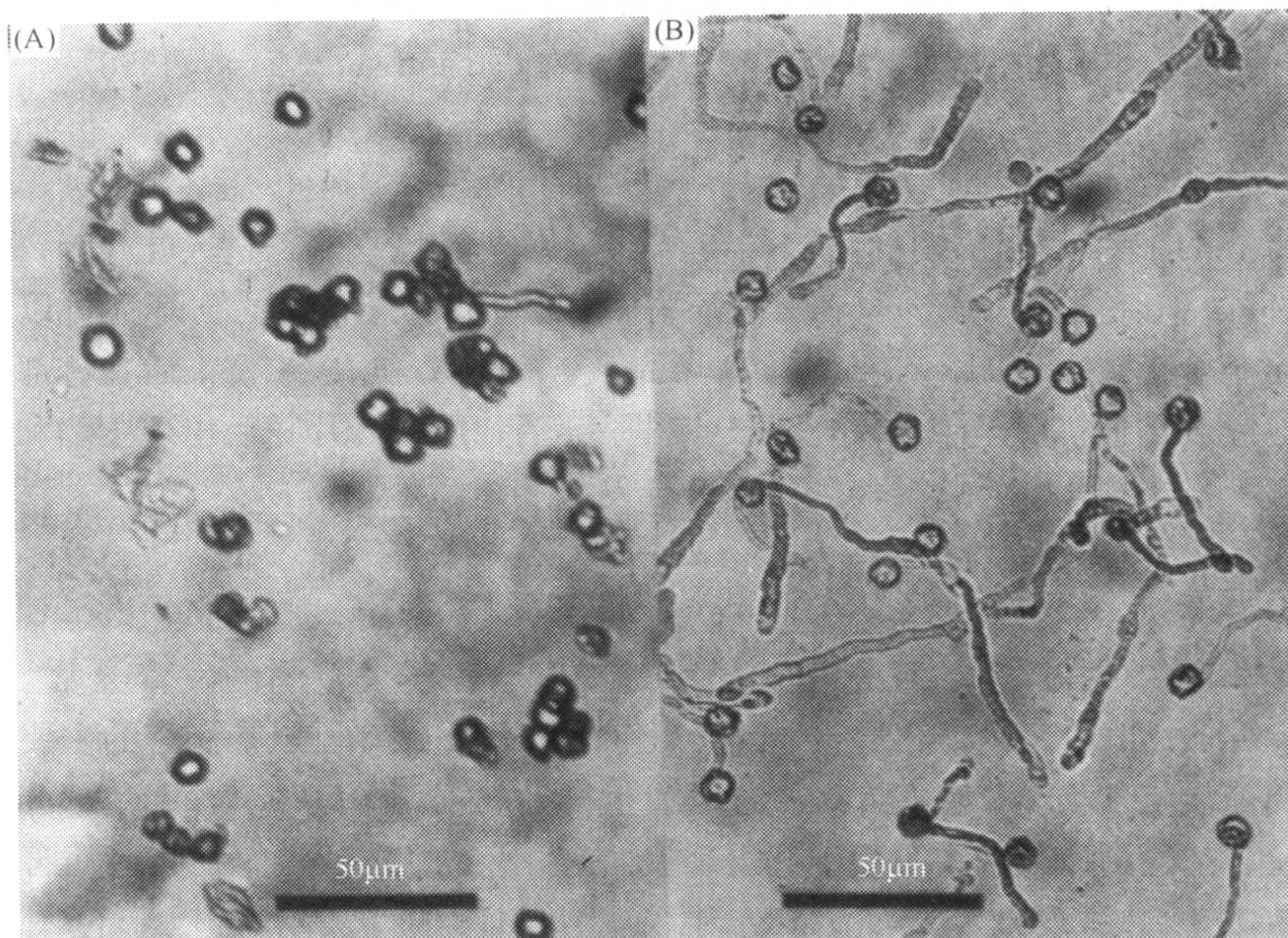


图 3.1 烟草环斑病毒（TRSV）的侵染对大豆花粉粒的萌发和芽管（germ tube）生长的影响。花粉粒在30%的蔗糖中萌发过夜。(A) 受侵染的花粉；(B) 健康花粉。经允许，引自 Yang 和 Hamilton (1974)。

3. 黄化病

引起叶片黄化症（yellowing）的病毒不如导致花叶症的病毒种类多。但是有些病毒，如引起甜菜黄化的病毒具有相当大的经济重要性。病毒侵染第一个信号通常是幼叶上出现明脉或者叶脉黄化（彩色图版 3.14），然后是随后叶片的普遍黄化（彩色图版 3.15）。这种黄化症或重或轻，没有花叶的形成，但是在有些叶片上会存在黄化和正常组织。在草莓黄（边）缘病中，黄化部分很大程度上局限于叶片边缘。当病害严重时，黄化病可导致作物完全受损（Weidemann *et al.*，1975）。

4. 卷叶病

病毒侵染也会造成卷叶（leaf rolling），通常上卷（彩色图版 3.16），偶尔也会下卷。叶柄明显的偏上性（epinasty）有时也是卷叶病的一个显著特征。

5. 环斑病

许多病毒病的主要症状是叶片上形成同心环和不规则的线纹（彩色图版 3.17），有时在果实上也出现相同症状（彩色图版 3.18 和彩色图版 3.19）。线纹可能由黄化的组织或表面数层死亡的细胞组成，产生蚀纹（etch）症状。对于十分严重的病害，叶片盘层可能彻底坏死。就环斑（ring spot）病毒而言，如 TRSV，存在一个明显的趋势，即植物经过最初侵染休克阶段后可恢复至无症状态。症状已经呈现的叶片不会出现这种情形，但是幼叶中即使含有病毒也可不表现明显症状。其他器官如鳞茎也可能出现环斑症状（Asjes

et al.，1973）。PVY的块茎坏死环斑株系通常在芽眼周围引起马铃薯块茎环斑，块茎呈现凹陷（sunken）和坏死（Beczner *et al.*，1984；Weidemann and Maiss，1996）。

6. 坏死病

病毒病的主要特征还包括组织、器官或整个植株死亡。病毒进入叶片后，造成叶片沿叶脉坏死（彩色图版3.20）。在有些病害中，整个叶片可能死亡。坏死可以相当迅速地扩展至整个植株。例如，在某些马铃薯品种上，PVY和PVX侵染后在茎部产生坏死条纹。坏死会迅速扩展至生长点，生长点被杀死后，所有叶片随后出现萎陷和死亡，这种系统坏死病出现之前，将要坏死的部分会发生萎蔫。

7. 发育异常

感染病毒的植株除了比正常植株矮小外，还会表现大范围的发育异常（developmental abnormality）。发育异常导致的畸形（deformation）可以是病害的主要症状，也可伴随其他症状发生，如在花叶病中经常发生叶片的不均匀生长。深绿色部分向上凸起形成泡状，叶缘的形状变得不规则并出现扭曲（彩色图版3.21）。在某些病害中，叶片的生长基本上完全被抑制，如CMV和（或）TMV侵染的番茄（彩色图版3.22）（Francki *et al.*，1980a）。

有些病毒会造成茎部膨大，在木本植物中膨大的部分会变得坚实，如可可肿枝病。另一类生长畸形是耳状突起（耳突），常沿着叶脉发生于叶片的上表面或者下表面（彩色图版3.23）。耳突可以是组织的小皱褶，或者是较大的、形状不规则的片状结构，或者是长的纤维状突起。感染病毒植株的正常生长要受到抑制，例如，一种侵染曼陀罗（*Datura metel*）的马铃薯Y病毒属病毒（potyviruses）可导致果实缺少正常的刺（spine）（Rao and Yaraguntiah，1976）。

病毒可引起多种类似瘤状物的生长。瘤组织不像耳突那样有序，有些由茎或果实上的螯生物组成。研究最多的就是WTV产生的瘤组织，产生伤瘤是这类病害的典型特征（彩色图版3.24）。在被系统侵染的植物中，外侧瘤状物发生于受伤的叶片和茎部的表面。在受侵染的根中，伤瘤组织开始出现于接近中柱鞘（pericycle）细胞的部位，这是因为正在发育的侧根突破皮层（cortex）时中柱鞘细胞出现伤口的缘故。WTV还可在叶片、茎和根的韧皮部（phloem）内引起许多小的内部肿瘤（Lee and Black，1955）。

在有些木本植物中，一些病毒可导致茎部开裂（splitting）和瘢痕（scaring）等畸形症状。

砧木（rootstock）或接穗（scion）受到病毒侵然后会引起坏死（necrosis）和（或）嫁接失败（彩色图版3.25）。

在某些芭蕉属（*Musa*）植物品种上，BSV引起的不常见的症状之一是果实串着生于假茎（pseudostem）的侧方而非顶部（彩色图版3.26），这是由于顶芯叶（cigar leaf）坏死造成的。

8. 萎蔫

顶部萎蔫以及随后整株植物的死亡也是病毒引起的重要特征之一（如鹰嘴豆上的一

些病毒病害，Kaiser and Danesh，1971）。

9. 发病后的恢复

植物发病一段时间后，即使病毒仍然存在，但是新生部分的症状出现减轻或消失。这种情形并非罕见，其中以线虫传多面体病毒属（*Nepovirus*）的侵染较为常见。这种现象受到多种因素的影响。病毒侵染时植株的发育阶段可显著影响发病程度，如接种BCTV的烟草表现出病害症状，这一阶段之后通常就是恢复期。如果接种病毒的植株非常幼嫩，一部分植株即使含有病毒也可能从不表现症状（Benda and Bennett，1964）。除寄主种类或品种和病毒株系外，环境因素也可影响植物发病后的恢复（recovery）。

第10章的第Ⅲ节R部分将在分子水平上对发病后的恢复加以讨论。

10. 根瘤减少

许多人已报道了豆科植物感染病毒的后果，即根瘤菌根瘤的数量减少、体积缩小以及鲜重降低（如感染AMV的苜蓿，Ohki *et al.*，1986；感染CMV的豌豆，Rao *et al.*，1987）。总体而言，固氮作用都会由于病毒的侵染而降低。苜蓿感染AMV以后，每单位鲜重根瘤的固氮作用与健康植物相同，但是感病植物的根瘤组织的数量减少，使得单株植物的固氮水平降低（Dall *et al.*，1989b）。

11. 遗传效应

BSMV的侵染会诱发玉米的突变率和畸变率（aberrant ratio，AR）的增加（Sprague *et al.*，1963；Sprague and McKinney，1966，1971）。例如，受病毒感染的遗传组成为 A_1A_1，$PrPr$，$SuSu$ 的父本与抗病毒的纯和隐性系（a_1a_1，$prpr$，$susu$）杂交后，就一个或多个遗传标记而言，后代系中出现严重偏离于预期比率的频率是很低的（A_1-a_1＝糊粉颜色有或无；$Pr-pr$ ＝糊粉紫色或红色；$Su-su$ ＝含淀粉或糖的种子）。只有当最初的父本被侵染而且上部叶片表现病毒症状的时候，才能观察到这种AR效应。AR效应是以一种稳定的方式遗传的，即回复到正常比率的频率较低，而且在检测不到病毒的植株中仍可遗传。WSMV也可诱发AR效应（Brakke，1984）。AR效应的遗传学比较复杂，涉及的现象很可能不止一种。病毒基因组是部分还是全部以cDNA拷贝的形式整合到寄主的基因组当中，目前还缺乏证据。Brakke（1984）曾对AR效应进行过综述，进一步的工作可能会发现类似现象在受病毒侵染的其他植物上也会出现。

C. 诱发类似病毒症状的因子

一定范围的物理、化学和生物因子可引发类似病毒病害的症状。这类病害与病毒病害可能含有共同的因子。有时这类因子会使我们得出错误的结论，误认为这类病害是由于病毒的侵染而发生的。当病毒和其他因素共同导致一种病害时，就会引发进一步的混淆。

1. 小的细胞寄生物

症状表现为叶片普遍黄化、矮化、腋生枝丛枝生长和花变叶（phyllody）的一类病

害，多年来一直被认为是由于病毒侵染而造成的。这类病害不能经由机械传播，认为它们是由病毒引起的主要有几方面的原因：① 未发现细菌、立克次氏体、真菌或原生动物（protozoa）；② 它们可以经嫁接传播；③ 它们可由叶蝉传播；④ 有些至少可以通过菟丝子（dodder）传播。

菌原体和螺原体属于菌原体目，其特征是具有明显的单位膜、多型性（pleomorphic）、无细胞壁、对青霉素有抗性。

类立克次氏体与菌原体目的显著差异在于类立克次氏体有细胞壁，而且对青霉素具有活体敏感性。已在多种韧皮部组织中发现了类立克次氏体。

Doi 等（1967）和 Ishiie 等（1967）的开拓性实验证明类菌原体（现在称为植原体，phytoplasma）、螺原体（spiroplasma）和类立克次氏体（rickettsia-like organism）能够引起植物病害（Windsor and Black，1973），从而建立了植物病理学的一个新的分支。这类病原通常存在于受侵染植物的韧皮部（phloem）和木质部（xylem）中，因为太微小，通过光学显微镜难以观察到。电子显微技术的广泛应用使得此类病原在植物病理学中的重要性得以公认。Maramorosch 和 Raychaudhuri（1988）对植物植原体病害做了描述，Davis 和 Sinclair（1998）以及 Lee 等（1998）综述了植原体的近期研究进展。目前植原体的分类主要依据其 16S 核糖体 RNA 的分子特征（Marcone *et al.*，1999；Webb *et al.*，1999）。

植原体和病毒同时侵染所引发的病害要比二者单独侵染引发的危害严重。例如，OBDV 和翠菊黄化植原体均寄生于韧皮部，都可通过叶蝉［*Macrosteles fascifrons* (Stäl.)］传播。二者混合侵染后可导致植株出现严重矮化，症状比各自单独侵染要严重（Banttari and Zeyen，1972）。

2. 细菌

有些细菌可引起类似病毒病的症状。例如，将一种未知而偶发的细菌机械式接种于豇豆叶片后，叶片上出现局部坏死斑。

3. 节肢动物产生的毒素

昆虫和其他节肢动物取食植物后分泌很强的毒素，毒素在植物体内系统移动产生类似病毒病的症状。一种同翅目昆虫 *Calligypona pellucida*（F.）分泌的唾液中的毒素可造成生长普遍延缓并抑制分蘖。只有雌虫能够分泌这类毒素（Nuorteva，1962）。

瘿螨（eryophyid）取食三叶草后，可导致幼叶上出现一种类似花叶的斑驳症状。一只螨就足以引起这种症状。这些瘿螨很小而且寄生于叶片内，往往被人们所忽略。现已发现，山桃上的一种类似病毒花叶病的症状是由瘿螨的一个新种引起的（Elliot *et al.*，1987）。

发生鼠耳病（wallaby ear disease）的玉米植株变得矮小，叶片下表面出现瘿瘤（gall），有时瘿瘤比正常部位的颜色要深，为深绿。Ofori 和 Francki（1983）的研究表明，这种类似病毒病的表现是由叶蝉（*Cicadulina bimaculata*）分泌的毒素造成的。

4. 遗传畸形

园艺学家已经选育出多个观赏植物的栽培品种，因为这些品种具有可遗传的叶部彩斑（variegation）或花叶，这些表型通常是由于母本遗传的质体（plastid）缺陷造成的。彩斑的类型有时与病毒引起的花叶非常接近。然而，在质体突变导致的花叶中，不同颜色组织区域之间的分界要比多种病毒引发的花叶明显。

遗传畸形也可引起其他类似病毒病的症状。例如，Edwardson 和 Corbett（1962）描述了 Marglobe 番茄的一种“线状”（wiry）突变体，外观与受 CMV 和 TMV 的侵染的植株相似。突变体的上部叶片不呈现片状结构（见彩色图版 3.21），这与病毒侵染的症状相似。但是这种病害不能通过嫁接传播，遗传学实验表明这种突变体表型是由一对隐性基因控制的。

5. 转座子

转座子是一类能在植物（或动物）基因组上跳跃的移动元件，包括两种类型：一类称之为真正的转座子，如 *Ac*/*Ds* 和 *MuDR*/*Mu* 玉米转座子（Walbot，2000）；另一类是反转录转座子，第 2 章第Ⅳ节对此有更为详细的描述。如果在叶片或花的发育过程中，转座子插入到一个或几个调控颜色的基因之中，便可导致类似病毒病症的不同颜色的斑点或条纹。当发现很可能是由于转座子移动而导致的明显的花碎色时，应该特别注意。

6. 营养缺乏

营养缺乏可能会导致植物出现叶组织的非正常着色、变色或死亡，有些情形相当容易与病毒侵染所引发的症状相混淆。例如，大豆中镁和铁的缺乏会导致绿色脉带症状，叶脉间区域出现褪绿。然而与病毒侵染产生的黄化症比较，营养缺乏导致的黄化呈漫射状。甜菜因缺镁而出现的黄化和坏死与 BYV 导致的症状相似。钾和镁的缺乏会导致马铃薯的叶缘和脉间坏死，这些与某些马铃薯病毒病的症状相似。

7. 高温

高温可导致植物出现类似病毒侵染的症状。烟草在 37.8℃生长 4～8 天后恢复到 22℃，新叶上出现花叶、明脉、褪绿以及其他类似病毒侵染的症状（图 3.2）。在随后长出的新叶上，症状会逐渐消失。但是这些植株经过第二次高温处理后，又会表现同样的症状（John and Weintraub，1966）。各种寄主上的机械接种和嫁接实验以及电镜观察都不能证明热处理植株中病毒的存在。

8. 激素损害

商业化的除草剂会导致某些植物出现类似病毒的症状。番茄和葡萄对 2,4-D 尤其敏感，在这些植物和其他寄主上，2,4-D 导致的叶片生长畸形与某些病毒的侵染相似。2,4-D 类化合物几乎可完全抑制叶肉的发育，植株看起来类似“鞋带”一样纤细。与叶肉相比，叶脉生长得慢，使得叶脉间叶肉凸出，外观与卷叶病有些相似。

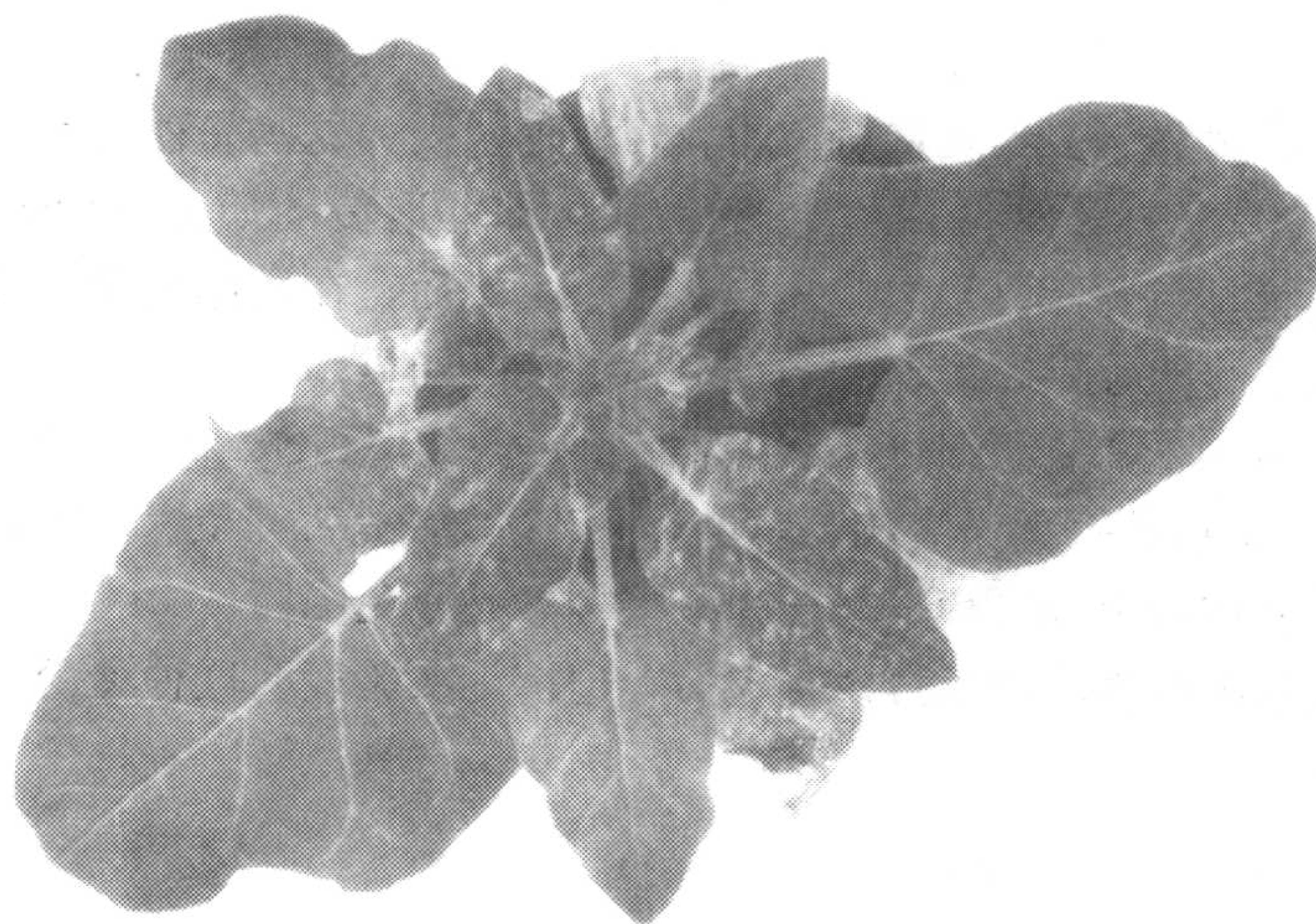


图 3.2 光烟草（*Nicotiana glauca*）在高温下（37.8℃）生长一段时间后表现出类似病毒侵染的症状。经允许，引自 John 和 Weintraub（1966）。

9. 杀虫剂

某些杀虫剂也可使植物出现类似病毒侵染的症状，这方面已有报道（Woodford and Gordon，1978）。

10. 空气污染物

多种空气污染物可抑制植物生长，其引起的症状易与病毒的侵染混淆。例如，水泥厂排放的废气可造成玉米植株矮小、黄化、坏死和叶缘卷曲。

D. 隐潜病毒

隐潜病毒（cryptoviruses）以前未被检测到，主要是因为多数隐潜病毒不引起明显的症状，或者在有些情况下，仅造成极为轻微的症状。这类病毒不能通过机械接种或介体传播，但可通过花粉或种子有效传播。在受侵染的植株中，隐潜病毒的浓度很低（Boccardo *et al.*，1987）。

第Ⅲ节　组织学变化

病毒导致的宏观症状常常反映了植物体内的组织学变化，主要包括 3 种类型：坏死、细胞减生和细胞增生。在一种特定的病害中，这 3 类组织学变化可单独出现，也可一起出现。例如，在柑橘裂皮病（citrus exocortis disease）中，这 3 类组织学的变化就密切相关（Fudl-Allah *et al.*，1971）。

A. 坏死

坏死（necrosis）作为病毒病害的主要特征已在第Ⅱ节 B.5 中讨论过。在其他病害中，坏死可能局限于特定的器官和组织，也可能是局部发生。坏死通常是和其他组织变化共同出现的。坏死可能是病毒侵染的第一个可见的特征，或者出现于侵染过程的最后阶段。例如，莴苣花叶病毒会导致莴苣表皮细胞或中脉薄壁组织坏死（Coakley *et al.*，1973）；TNV 引起的坏死通常限于根的局部（Lange，1975）；TMV 对无毒番茄植株的晚期侵染可导致未成熟果实内部出现坏死（Taylor *et al.*，1969）。

就马铃薯卷叶病而言，感病植株的韧皮部发育正常，但是会因病毒的侵染而死亡。坏死在整个植株的韧皮部内扩散，但是仅限于这类组织（Shepardson *et al.*，1980）。

在受 TRSV 侵染的天竺葵属植物中，通过光学显微镜发现，仅繁殖组织中出现了组织学变化（Murdock *et al.*，1976）。花粉粒的败育和畸形以及胚珠不孕的现象很普遍，这类症状可能会与遗传学上的雄性不育相混淆。

B. 细胞减生

叶片表现花叶症状后，细胞减生（hypoplasia）导致叶片的黄化区域比深绿色区域薄，叶肉细胞分化程度低、叶绿体数量少、细胞间空间减小或消失（图 3.3）。

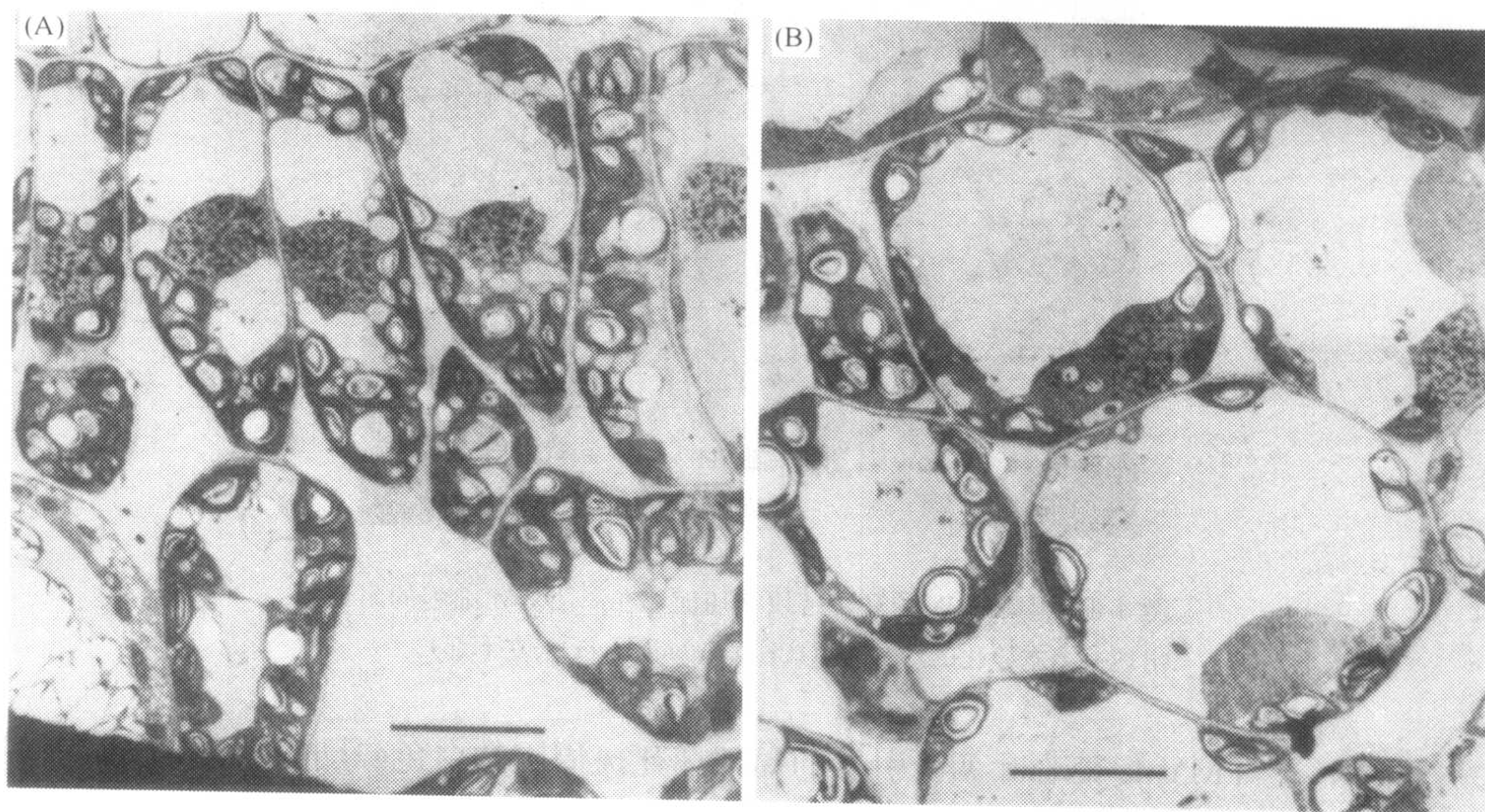


图 3.3　TMV 在烟草中引起的组织学和细胞学变化。（A）在显花叶症状的叶片中，深绿色区域内栅栏细胞的切面，细胞表现基本正常；（B）黄绿交界区域附近的切片，细胞体积大且在形态上未分化，细胞核不像深绿色区域中的细胞核那样位于细胞的中央。比例尺 = 20 μm。经允许，引自 P. H. Atkinson。

在苹果茎痘病（stem-pitting disease）中，将植株的树皮揭起后，凹陷即呈现于树干表面。凹陷的产生是由于有些形成层原始细胞（cambial initials）未能正常发育成细胞，使得韧皮组织形成一种嵌入新形成的木质部组织的楔形结构（Hilborn *et al.*，1965）。受感染的韧皮部出现坏死。

ASGV 在苹果树枝干上的主要解剖学特征是茎沟部位的形成层消失，正常的韧皮部和木质部分子（xylem element）被很大程度上未分化的薄壁组织所代替（Pleše *et al.*，1975）。

因病毒侵染而造成的花粉粒变小和花粉管生长的减少均可视为细胞减生效应（图 3.1）。花粉粒感染病毒后出现的其他变化已有描述（Haight and Gibbs，1983）。

C. 增生（hyperplasia）

1. 细胞超常增大

明脉症状，至少对某些病毒而言是由于叶脉附近的细胞增大造成的（Esau，1956）。细胞间隙变小和叶绿素的减少导致叶脉组织变得异常透明。

2. 已分化细胞中的细胞分裂

一些病毒，如 PVX 可在马铃薯块茎上产生坏死细胞岛。在坏死部位附近的细胞区带中，块茎可能以一种典型的创伤反应做出应答。其结果是淀粉粒消失，而且活跃的形成层开始发育（图 3.4）。

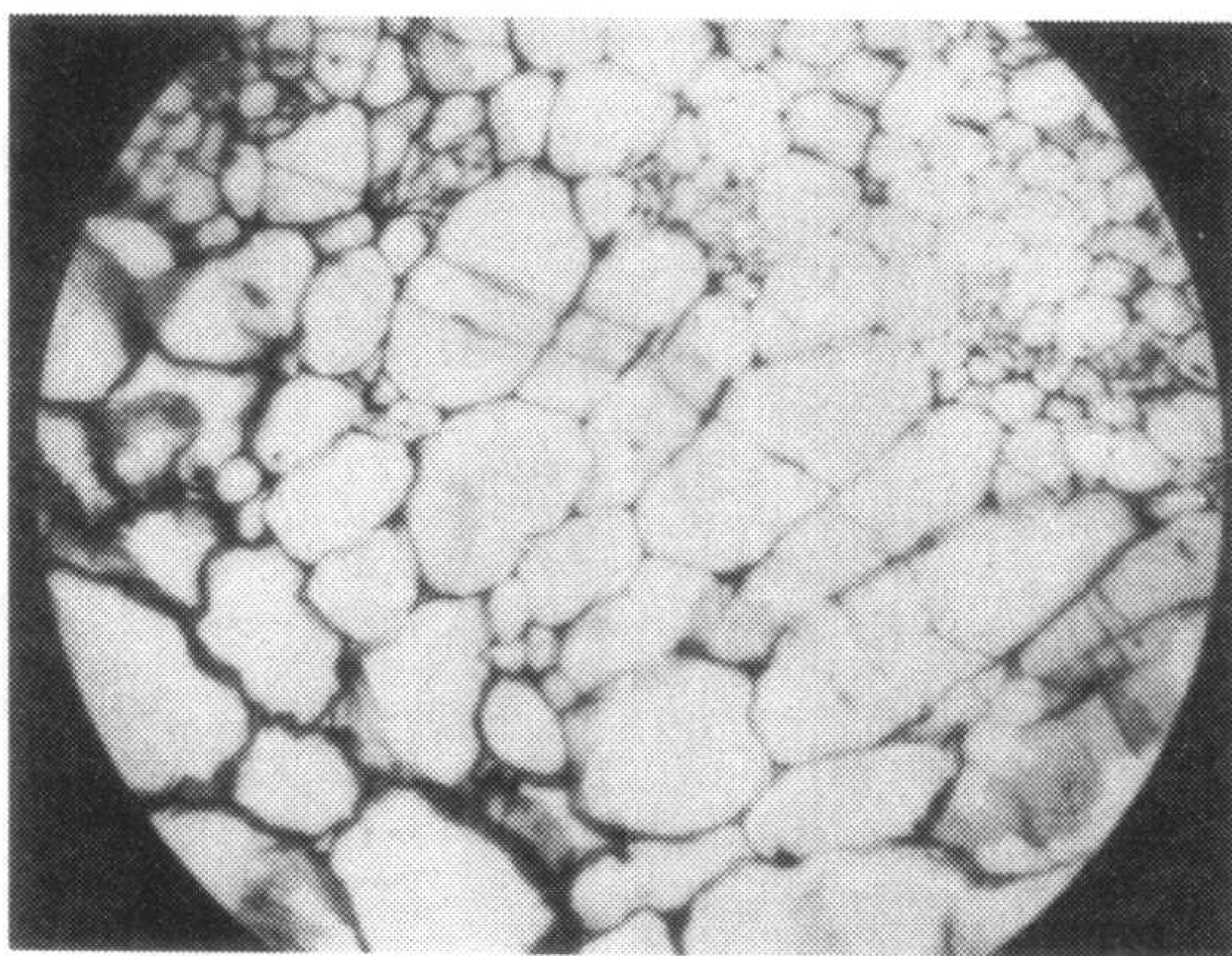


图 3.4　感染 PVX 的马铃薯块茎切面，在一团坏死细胞的附近出现一个木栓化的形成层（cork cambial layer）（左下部）。

同样，在 TMV 侵染心叶烟所引发的局部坏死斑周围的白色晕圈区域内，成熟栅栏细胞中发生细胞分裂（Wu，1973）。

3. 形成层细胞的异常分裂

病毒引起的增生现象似乎更容易在维管组织中出现。感染可可肿枝病的枝条中形成的木质部组织在结构上与正常木质部相同，但数量差异显著（Posnette，1947）。在 BCTV 侵染的植株中形成大量畸形的筛分子，有时会与伴胞结合。细胞的排列混乱，随后出现死亡（Esau，1956；Esau and Hoefert，1978）。OBDV 可引起燕麦韧皮部发育的异常，包括细胞增生和韧皮部原形成层（procambium）有限的过度生长（hyper-

trophy）（Zeyen and Banttari，1972）。

WTV 侵染的深红色三叶草中，韧皮部形成层细胞发育异常。在叶片、茎和根部的韧皮部中，韧皮部薄壁组织形成了分生组织瘤细胞（Lee and Black，1955）。

斐济病毒属（*Fijivirus*）病毒诱发的细胞增殖可导致甘蔗的成熟叶片上出现瘿瘤（gall），这是由叶脉中的维管束极度扩张造成的（图 3.5）。主要有两类异常的细胞——木质化的瘿瘤木质部细胞和非木质化的瘿瘤韧皮部（Hatta and Francki，1976）。韧皮

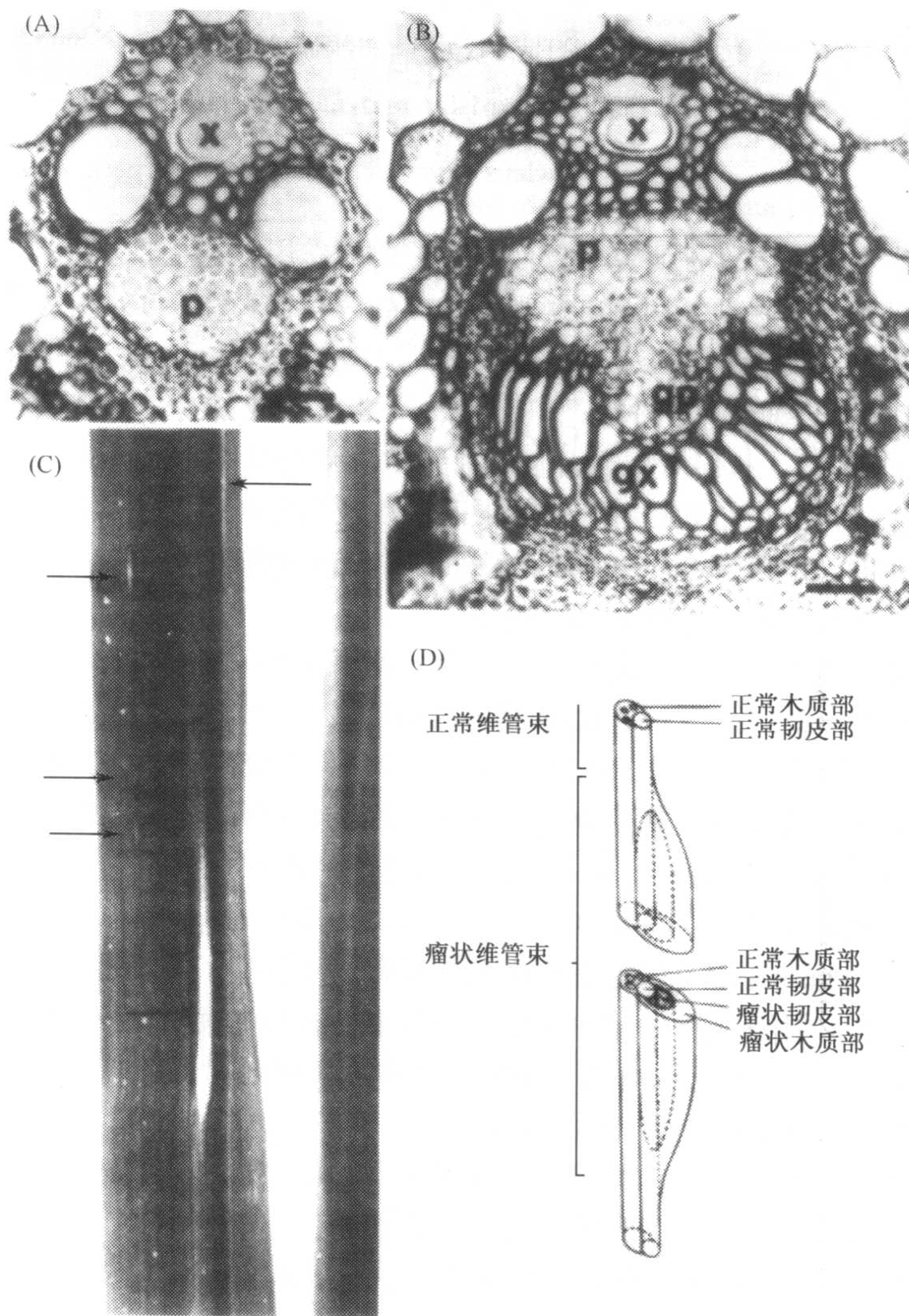


图 3.5　甘蔗受 FDV 侵染后叶片上形成的瘤（gall）的结构。（A）健康甘蔗植株叶脉中维管束组织的横切面，图中所示为木质部（x）和韧皮部（p）组织；（B）感染 FDV、长有瘤的甘蔗叶片的叶脉中维管束组织的横切面，图中所示为正常的韧皮部（p）和木质部（x）以及瘤韧皮部（gp）和瘤木质部（gx）（比例尺 = 0.5 μm）；（C）感染 FDV 的甘蔗叶片，图中所示为大的和小的瘤（箭头所示）；（D）FDV 侵染的甘蔗叶脉中组织的分布图，图中所示为正常组织和瘤组织。经允许，引自 Egan 等（1989）。

部的增生生长在 PPV 侵染的李树上非常明显（Buchter *et al.*，1987）。

第Ⅳ节　细胞学变化

从早期通过光学显微镜在病组织中寻找病原物到现在的病毒学研究，病毒引起的细胞学变化一直是研究的兴趣所在。大约在 20 世纪初，研究发现了两类病毒内含体——无定形体或“X 体”和晶状体。X 体类似于某些特定的微生物，有些研究者将它们误认为寄生物或者致病寄生物的生活史中的一个阶段。这些早期的研究也并非是完全错误的，因为许多 X 体确实是病毒侵染引发的一种细胞学结构，是病毒组分合成与组装的场所。

A. 方法

光学显微术在细胞异常性研究中依然起着重要的作用，这主要基于如下原因：①可扫描更大的组织区域，保证了用于电镜观察的样品具有代表性；②将电镜观察和早期的在相同材料上进行的光镜检查工作联系起来；③使用相差（phase contrast）和亮视野（bright field）照明可观察活的材料。

在过去的 30 年中，我们对病毒引起的细胞学变化的认识有了实质性的进展，这应归功于植物组织固定、染色和切片技术上的改进以及高分辨率电镜的广泛应用。与生物学的其他领域相同，电镜技术一方面在宏观观察和光学观察之间建立了一种关联，另一方面将分子生物学和生物化学研究结合起来。

超薄切片染色观察法已有标准程序，但冷冻蚀刻技术可以提供病毒引起的膜变化的有用信息（Hatta *et al.*，1973）。在病毒病的研究中，扫描电子显微镜的利用价值较小，但是有时也会用到（Hatta and Francki，1976）。应该注意的是：取样前植物的生长环境和样品制备过程中的细微差别都会对细胞器和病毒所诱发结构的外部特征及其稳定性产生显著的影响（Langenberg，1982）。固定前对组织进行骤冷处理可使极不稳定的病毒诱发的结构较好地保存下来（Langenberg，1979）。

将观察到的细胞学变化与病毒复制联系起来有助于我们了解受侵染细胞中事件发生的时程。一般而言，体外接种的原生质体是研究事件时程的优良材料。然而该方法也存在多种限制因素：①TMV 侵染的叶片细胞中存在的某些超微结构特征在原生质体（在 TMV 复制过程中）内观察不到（Otsuki *et al.*，1972a）；② TMV 侵染的叶片细胞所制备的原生质体中，结晶内含体被降解（Föglein *et al.*，1976）；③ 在体外接种的原生质体中，细胞学变化的发展与生长曲线的预示不同步。

第 9 章（第Ⅱ节 B）描述了荧光染料和共聚焦显微术的使用。

B. 对细胞结构的影响

1. 细胞核

Francki 等（1985a，b）曾就病毒侵染的细胞病理学影响做过详尽的阐述。许多病毒不会对细胞核产生明显的影响。其他病毒虽然不在核中复制，但是它们可产生各种核内含体，从而影响细胞核的大小和形状。

Shikata 和 Maramorosch（1966）在 PEMV 感染的豌豆叶片和豆荚中，发现病毒粒体首先在核中聚集。在病害发展的进程中，核仁发生解体。大量的病毒粒体聚集在细胞核中，细胞质中也存在大量的粒子。PEMV 也可导致核周隙内发生囊泡化（De Zoeten *et al*.，1972）。一些小的等轴病毒粒体在核（和细胞质）中聚集，以分散的颗粒或者晶状排列形式存在（如 SBMV，Weintraub and Ragetli，1970；TBSV，Russo and Martelli，1972）。Hatta 和 Matthews（1976）在几种芜菁花叶病毒感染的细胞核中观察到了大量的病毒蛋白和空的病毒蛋白壳（图 3.6）。

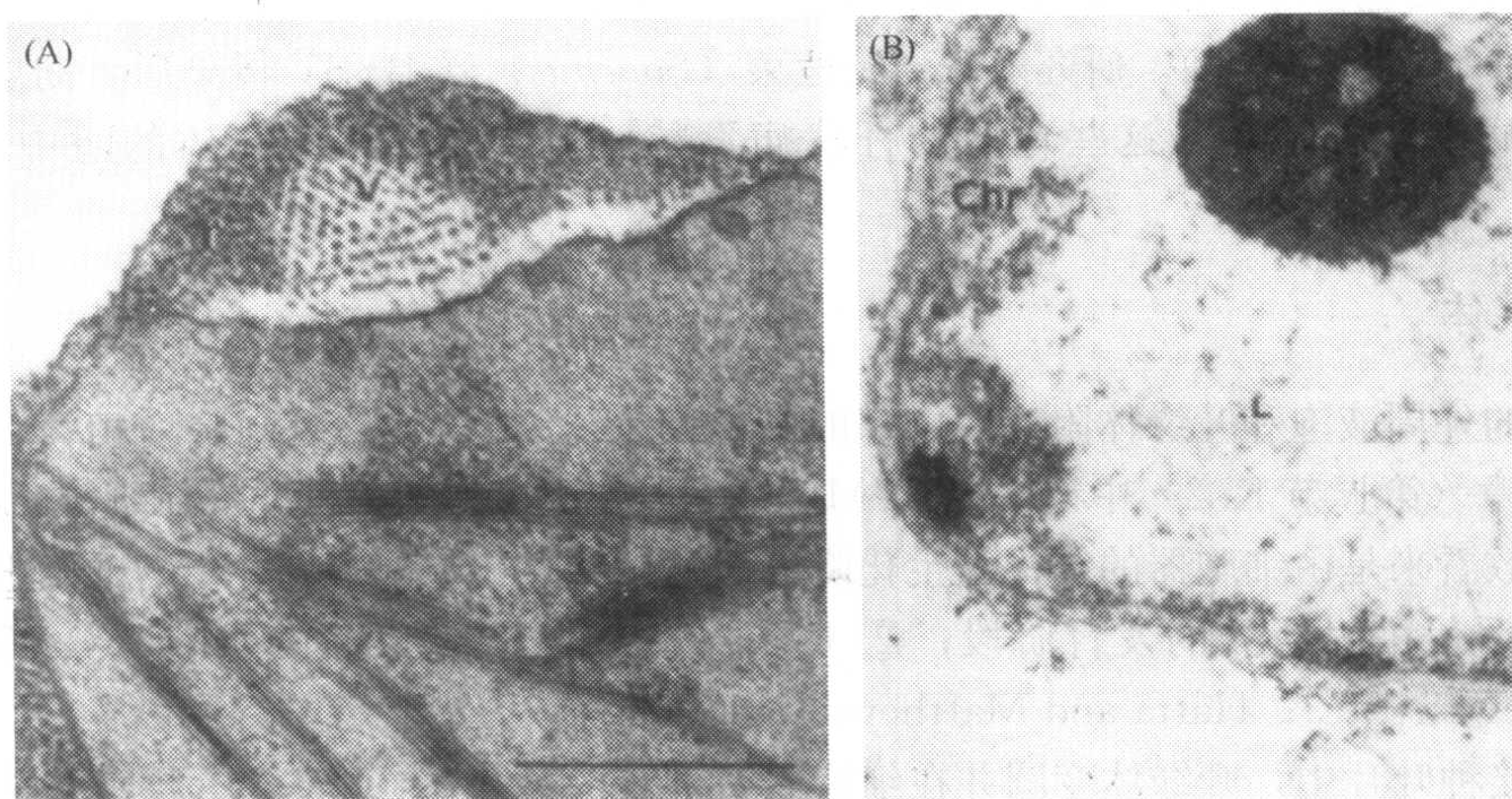


图 3.6　TYMV 在细胞内的部位和 TYMV 的蛋白质积累。(A) 处于 C 阶段的细胞经质壁分离（plasmolysis）处理后，细胞质中电子透明区域存在小的呈晶状排列的 TYMV 粒体。比例尺＝ 500 nm；r，核糖体；v，TYMV 粒体（Hatta and Matthews，1974）。(B) 未经质壁分离处理、处于 D 阶段的细胞核中 TYMV 外壳蛋白的积累（电子透明物质，L）。比例尺＝ 500 nm。依据 Hatta 和 Matthews（1976）的原图修改。

Kassanis（1939）通过光学显微镜在发生严重蚀纹症状的烟草细胞中观察到了片状结晶内含体。这些片状体从侧面看是双折射的，这是严重蚀纹侵染的非常规律的特征之一。核内含体在马铃薯 Y 病毒属的其他病毒中已有描述。

与核内含体和细胞质内含体有关的病毒编码的蛋白质在第 6 章（第Ⅷ节 C.1.b）讨论。感染 PVA 的烟草细胞的核仁中存在电子透明腔隙（Edwardson and Christie，1983）。对某些弹状病毒而言，病毒核衣壳出现于核中而且聚集在核周隙之中（图 8.19）。

双生病毒可引起核仁的显著膨大，体积可占据细胞核的 3/4。脱氧核蛋白形成纤维状环，大量的病毒粒体聚集在核中（Rushing *et al*.，1987）。Gracia 和 Shepherd（1985）描述了 CaMV 的一个分离物，病毒粒体充满细胞核后导致细胞核明显膨大。病毒粒体未被包入细胞质病毒的基质蛋白中。

2. 线粒体

与 BBWV-1 等轴粒子相似［图 3.9（C）］（Hull and Plaskitt，1974），TRV 的长杆状粒子附着于受侵染的细胞中的线粒体上（Harrison and Roberts，1968）（图 8.18）。在感染 CGMMV 的多种寄主和各种组织细胞的线粒体中，出现了一些与膜结合的小型

小泡（vesicle），这些小泡存在于线粒体边隙和嵴（cristae）中（Hatta *et al.*，1971）。

Kitajima 和 Lovisolo（1972）在感染 HMV 的曼陀罗（*Datura*）细胞中观察到了线粒体聚集物，但是没有迹象表明这些聚集物参与病毒的合成。有些病毒浸染可能导致线粒体膜系统的异常发育，这方面已有描述（Francki，1987），目前还未确定此现象与病毒复制的关系，它们可能只是线粒体降解的结果。例如，有些番茄丛矮病毒属病毒的侵染导致细胞质中出现多泡体（multivesiculate body）。已有证据表明，多泡体是由修饰程度很大的线粒体发育而来的（Di Franco *et al.*，1984；Di Franco and Martelli，1987）。在其他番茄丛矮病毒属病毒的侵染中，多泡体则来源于修饰过的过氧化物酶体（Martelli *et al.*，1984）。研究发现：苦苣菜（*Sonchus*）受 BYSV 侵染后，韧皮部细胞中存在病毒粒体，而且这些弯曲的杆状病毒粒体经常会插入线粒体的嵴中（Esau，1979）。

3. 叶绿体

小的外周液泡和叶绿体附近及内部的其他变化与 TYMV 的复制密切相关，这些将在第 8 章（第Ⅳ节 K.2）中讨论。TYMV 侵染能引起叶绿体发生许多其他的细胞学变化，多数看来是由细胞器的结构与生化降解而致。叶肉细胞中事件发生的准确进程依赖于：① 受侵染时所处的发育阶段；② 病毒的株系；③ 侵染后的时间；④ 环境条件（Matthews，1973；Hatta and Matthews，1974）。

在接种叶片中，叶绿体变圆并在细胞中聚集在一起。基粒和基质片层所受的影响很小。叶绿体变为杯形，开口通常朝向细胞壁。淀粉粒发生聚集。TYMV 的“白化”（white）株系可导致接种叶中的基粒降解。在接种叶上方、已被病毒完全侵染但未表现花叶症状的展开叶中，病毒侵染对叶绿体的影响与接种叶相似。

对于那些受侵染时较小并表现典型花叶的叶片来说，很容易通过光镜区分新鲜叶部切片中叶绿体内的各种病理状态。花叶中各种不同色度（绿色、黄色和白色）的岛状组织中含有不同的病毒株系，它们以可辨别的、独特的方式对叶绿体产生影响（图 9.18）。深绿色的岛状组织中病毒含量很低，叶绿体看起来就显得比较正常。

在非深绿色组织类型中叶绿体所发生的重要变化有：① 颜色，从近于正常的绿色到无色；② 不同程度的聚集；③ 存在大型小泡；④ 叶绿体破裂；⑤ 基粒堆叠的高度减小；⑥ 存在嗜锇小球（osmiophilic globule）；⑦ 排列着植物铁蛋白（phytoferritin）分子。这些异常变化将在图 9.18 中加以描述。

TYMV 的不同株系可引发叶绿体中出现各种畸形，这些畸形还会以某些特定的组合出现。在某个类型的组织区域中，几乎所有的细胞表现同样的畸形，而且当新鲜的植株被接种时，这些畸形作为优势组织类型至少要持续一段时间。

所有芜菁黄花叶病毒属病毒都可诱导受侵染细胞的叶绿体中出现小的外周小泡，但是所记录的变化中没有一种是该属病毒侵染的必然结果；它们也不会被视为该组病毒的诊断依据。例如，OkMV 侵染的黄瓜中就未出现叶绿体的聚集。另一方面，TuMV 感染藜属（*Chenopodium*）植物后可导致叶绿体发生聚集（Kitajima and Costa，1973）。芜菁黄花叶病毒属（*Tymovirus*）之外的一些病毒会引发叶绿体外围出现小型小泡。这些小泡与 *Tymovirus* 型小泡不同，因为它们没有颈部使之与细胞质相连。在感染

TBSV 的曼陀罗中，类囊体膜发生了多种，而且明显的重排（Bassi *et al.*，1985）。对于这些病毒中的多数而言，小泡或其他变化似乎是侵染导致的退化的结果。然而，就 BSMV 而言，小泡似乎与病毒的复制有关（Lin and Langenberg，1984a）。

在许多情况下，侵染导致叶片细胞中淀粉粒的大小和数量都出现异常。就花叶病而言，淀粉的数量通常要比正常的少，但是在有些病害（如甜菜曲顶病和马铃薯卷叶病）发生时，则会出现淀粉的大量积累。同样，在感染 TMV 的黄瓜子叶上产生的局部斑中，叶绿体明显变大并充满淀粉粒（Cohen and Loebenstein，1975；参见第Ⅳ节 D）。

4. 细胞壁

植物细胞壁通常被视为一种物理支撑和屏障结构。事实上，细胞壁是一个独特的生物化学和生理学的区室，占叶片中某些酶的总活性的相当大比例（Yung and Northcote，1975）。在感染病毒的细胞的细胞壁内部或附近可观察到三种畸形（abnormality）：

（1）由于纤维素的沉积，在病毒引发的枯斑边缘附近的细胞发生异常增厚（Hiruki and Tu，1972）。细胞壁中发生的化学变化可能比较复杂，难于研究（Faulkner and Kimmins，1975）。

（2）陷入胞间连丝的细胞壁突出物在一些不相关的病毒导致的病害中已有报道。由胞间连丝进入细胞的突出物可能有一条或多条通道。这些通道可能较短或者很长，似乎是由病毒诱导的新的细胞壁物质沉积后形成的，它们可能分布于质膜内外（Bassi *et al.*，1974）。

（3）细胞壁和质膜之间出现电子致密物质的沉积，沉积物可能遍布细胞壁的大部分区域（与 ONMV 相同，Gill，1974），或者限于一定的范围并和胞间连丝结合（与 BSMV 相同，McMullen *et al.*，1977）。这类沉积物称为壁旁体（paramural body）。

CEVd 的主要细胞病理效应是在细胞壁附近（电子密度与质膜相似）诱导产生无数小的膜结合体（Semancik and Verwoude，1976）。这种病理效应存在于各种细胞类型之中。

5. 类菌体细胞

根瘤菌（*Rhizobium*）感染大豆根部细胞的第一个阶段（如侵染线的发展以及根瘤菌释放到细胞质中）似乎不受 SMV 侵染的影响。在第二阶段中，包膜在细菌细胞周围形成类菌体（bacteroid）。在受病毒侵染的根部观察到了结构上的差异，如包膜的囊泡化减少（Tu，1977）。

6. 类髓磷脂体

类髓磷脂体（myelin-like body）是由深度着色层通过一种同心的或不规则方式紧密挤压而成，这在一些病毒的侵染过程中已有描述（Kim *et al.*，1974）。类髓磷脂体反映出在一个或多个细胞膜系统中发生了降解变化。它们通常与嗜锇小球（被认为由细胞膜的脂质成分组成）结合。Kim 等认为，感染豇豆花叶病毒的菜豆叶片中产生的类髓磷脂体可能是由嗜锇小球形成的。

7. 细胞死亡

当细胞接近死亡时，其内部会发生剧烈的细胞学变化。这些变化已经通过光学显微镜和电镜进行了研究，但结果并不能告诉我们病毒侵染实际上是如何杀死细胞的。

C. 细胞质中病毒诱导的结构

细胞质中病毒诱导出现的特化区域，很可能是病毒合成与装配的场所（病毒质），这将在第 8 章讨论，这里将描述其他类型的内含体，即常见的结晶状内含体（主要由病毒粒体组成），或者体现马铃薯 Y 病毒科病毒典型特征的风轮状内含体。Christie 和 Edwardson（1977）对这些内含体的光镜和电镜的研究结果进行了综述。

1. 结晶状内含体

病毒粒体在受侵染的细胞中大量聚集，并在适宜条件下形成三维的结晶状排列。它们不断增大成为在光镜下可见的晶体，也可能仍然保持小的、仅在电镜下可见的结晶状排列。

病毒在寄主细胞内形成晶体的能力依赖于其自身特性，与组织中的病毒浓度或者提纯病毒形成晶体的能力无关。例如，TYMV 在体外极易结晶，且在受侵染的组织中浓度很高，但在组织中不能正常结晶。相反，即使在组织中浓度很低，TNV 的卫星病毒（sTNV）通常也会在细胞内形成晶体。

a. TMV

因 TMV 侵染而表现典型花叶的烟草叶片中，黄绿区域上的叶毛和表皮细胞中基本都含有结晶状内含体，而那些完全深绿区域中的叶毛和表皮细胞中则没有内含体的存在。黄绿和深绿组织交接部分非常明显，此区域邻近的叶毛中可能不含晶体，也可能有晶体的存在。Warmke 和 Edwardson（1966）跟踪了烟草叶毛细胞中晶体的形成过程。首先发现病毒粒体以一种小的聚集体的形式游离于细胞质中，聚集体中的病毒粒体末端并列呈平行的杆状，这些聚集体随后变大。正在增大的晶体不附着在膜上，随着晶体的多层排列，它们有时会整合到内质网、线粒体，甚至是两层之间叶绿体中上。

片状内含体非常不稳定，可被戳刺或者被其他损伤活细胞的方式破坏。从切面看，片状内含体呈双折射，但是从平面看，则观察不到。片状内含体含有 60%的水分，主要由紧密挤压的、平行的杆状物构成的连续片层组成，这些平行的杆状物并非与片层平面绝对垂直。连续片层中的杆状物彼此间相互倾斜。对 TMV 的有些株系来讲，通过冷冻蚀刻制备技术可观察到这种箭尾形效果（图 3.7）。有时可通过光学显微镜观察到长的、弯曲的、纤维状内含体，或者针状或纺锤形内含体，这些内含体主要由病毒粒体构成。病毒的不同株系可能形成不同种类的准晶（paracrystalline）排列。大多数结晶状内含体仅在细胞质中发现，但是有些已在核中检测到（Esau 和 Cronshaw，1967）。

b. BYV

在受 BYV 侵染植株的韧皮部细胞中可发现内含体，其他组织如叶肉中也存在内含体。光学显微镜下经常可见纺锤状内含体，有时也呈条带状［图 3.8（A）］。通过电镜可观察到数层弯曲的病毒杆［图3.8(B)］。大多数病毒内含体存在于细胞质中，Cron-

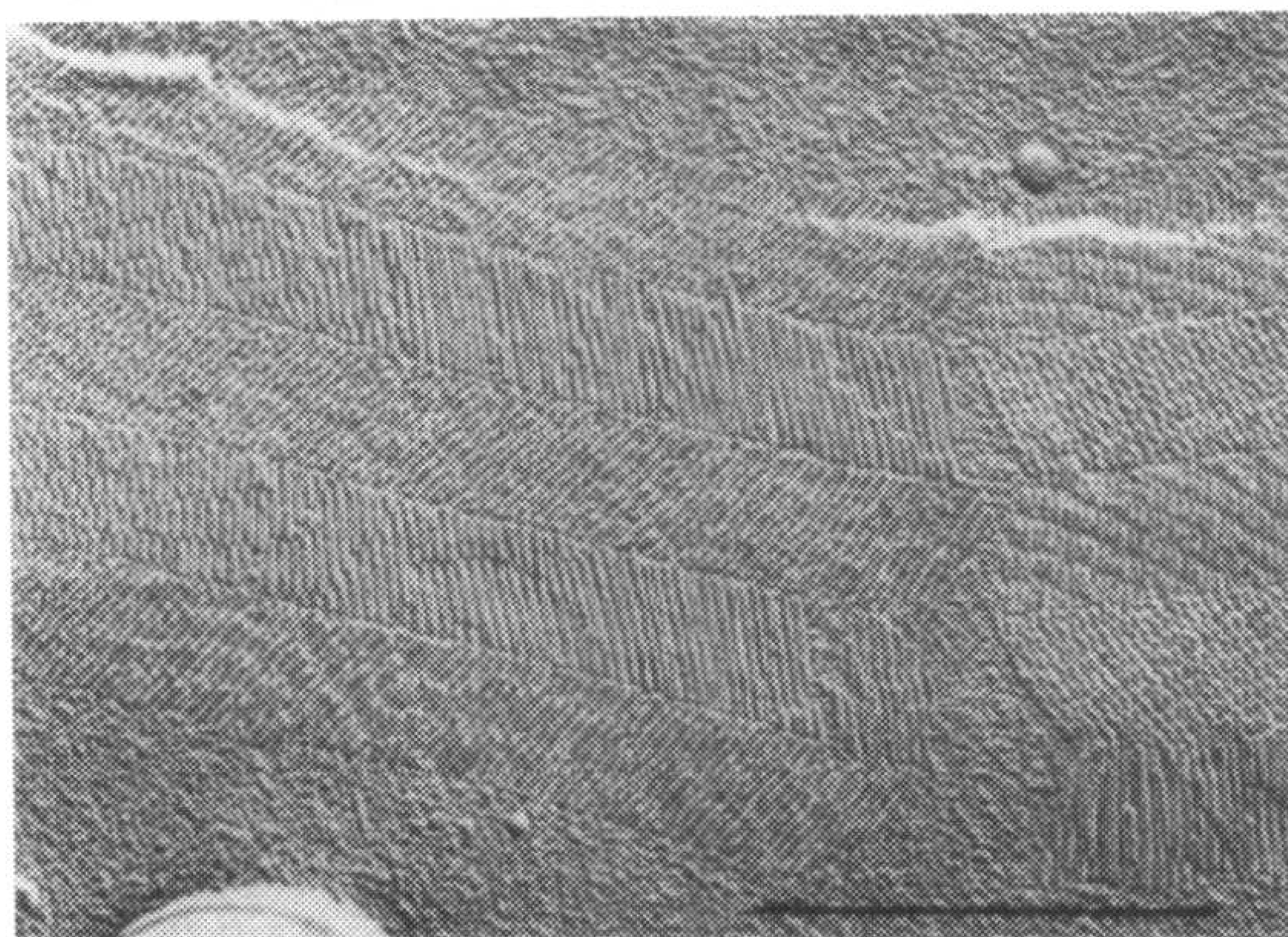


图 3.7　冷冻蚀刻法制备的 TMV 杆状粒体的晶体。经丙三醇浸透处理后，在叶肉细胞内排列的 TMV 晶体的一部分。即使在液泡膜（tonoplast）破裂的情况下，晶体仍保持了其特有的箭尾形结构，晶格间隙约为 24 nm；比例尺 = 1 μm。经允许，引自 Willison (1976)。

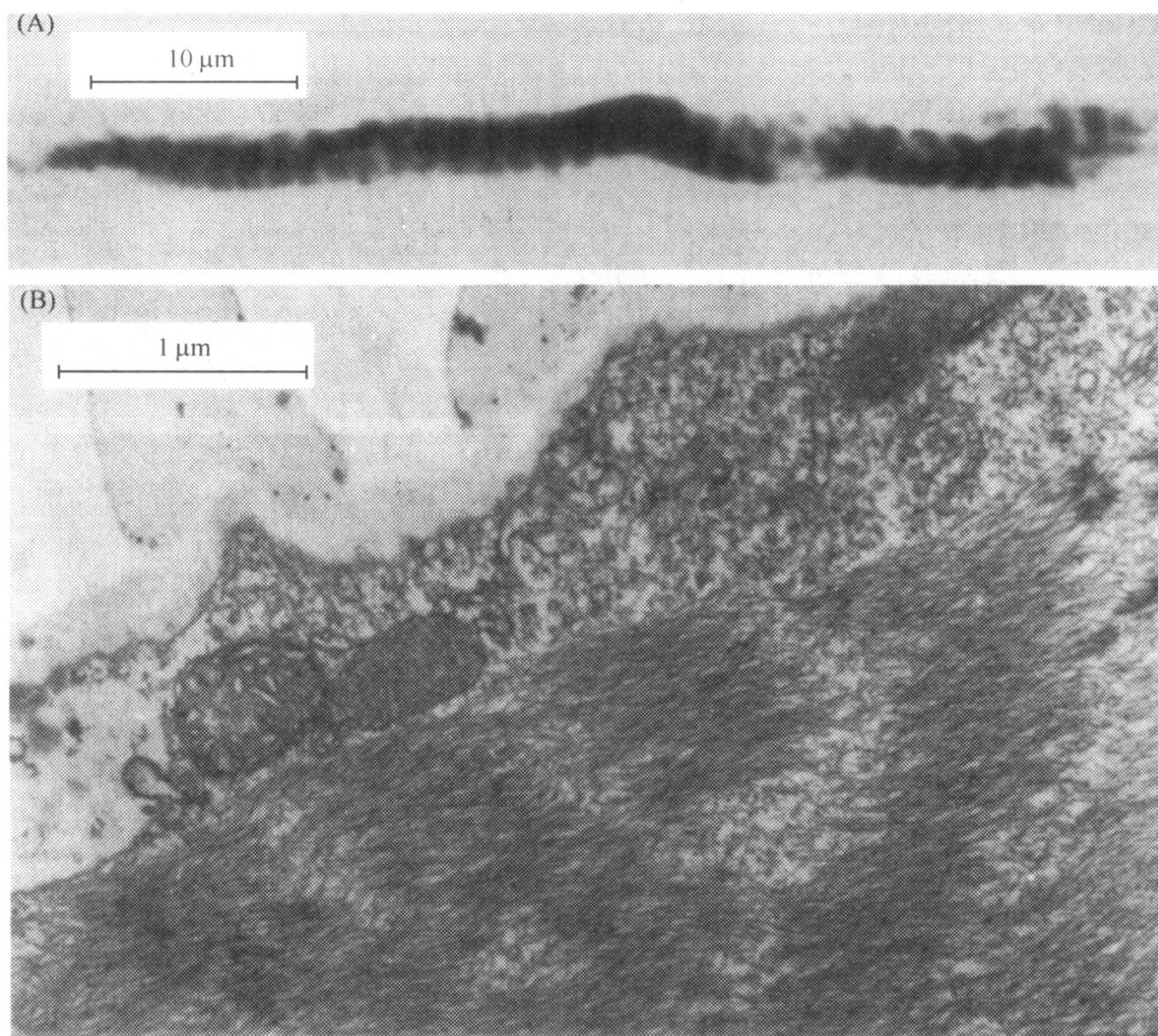


图 3.8　甜菜（*Beta vulgaris*）小叶脉的薄壁细胞中因 BYV 侵染而形成的内含体。(A) 和 (B) 分别为光学显微镜和电子显微镜下观察到的带状内含体。带状内含体由弯曲的、排列较为有序的病毒粒体组成。经允许，引自 Esau 等 (1966)。

shaw 等（1966）在细胞核与叶绿体中观察到了类似病毒粒体形成的小的聚集体。

c. 其他螺旋对称结构杆状病毒

其他组群的杆状病毒可能会在细胞内聚集成较为有序的排列。这种情况通常仅在电镜下才能观察到。除了病毒杆之外，聚集体中还可能存在其他物质。RCVMV 除了诱导产生病毒杆聚集体外，还可在细胞质中诱导形成大的结晶体（Khan *et al.*，1977）。这些结晶体中含有 RNA 和蛋白质，并由直径为 10 nm 的多面体粒子组成一种晶体排列结构。未发现病毒杆的存在。这类不寻常内含体的重要性目前尚不清楚。

d. 小的二十面体病毒

在受侵染的细胞中，含有许多由二十面体病毒组成的结晶体[图3.9(D)]。这类结晶体有时很大，可通过光镜观察到（如 TNV，Kassanis *et al.*，1970）。通常等面体病毒不会规则地排列，但是通过加热或者质壁分离去除一部分水之后便可使之规则排列（Milne，1967；Hatta，1976）。

BBWV 的许多株系可诱导形成由病毒粒体组成的圆柱形管状结构[图3.9(A)和(B)]。Russo 等（1979）描述了一个 BBWV 株系，其在细胞内形成非正常的、中空的小管，截面呈正方形或矩形。管壁由两排平行的病毒粒体组成。

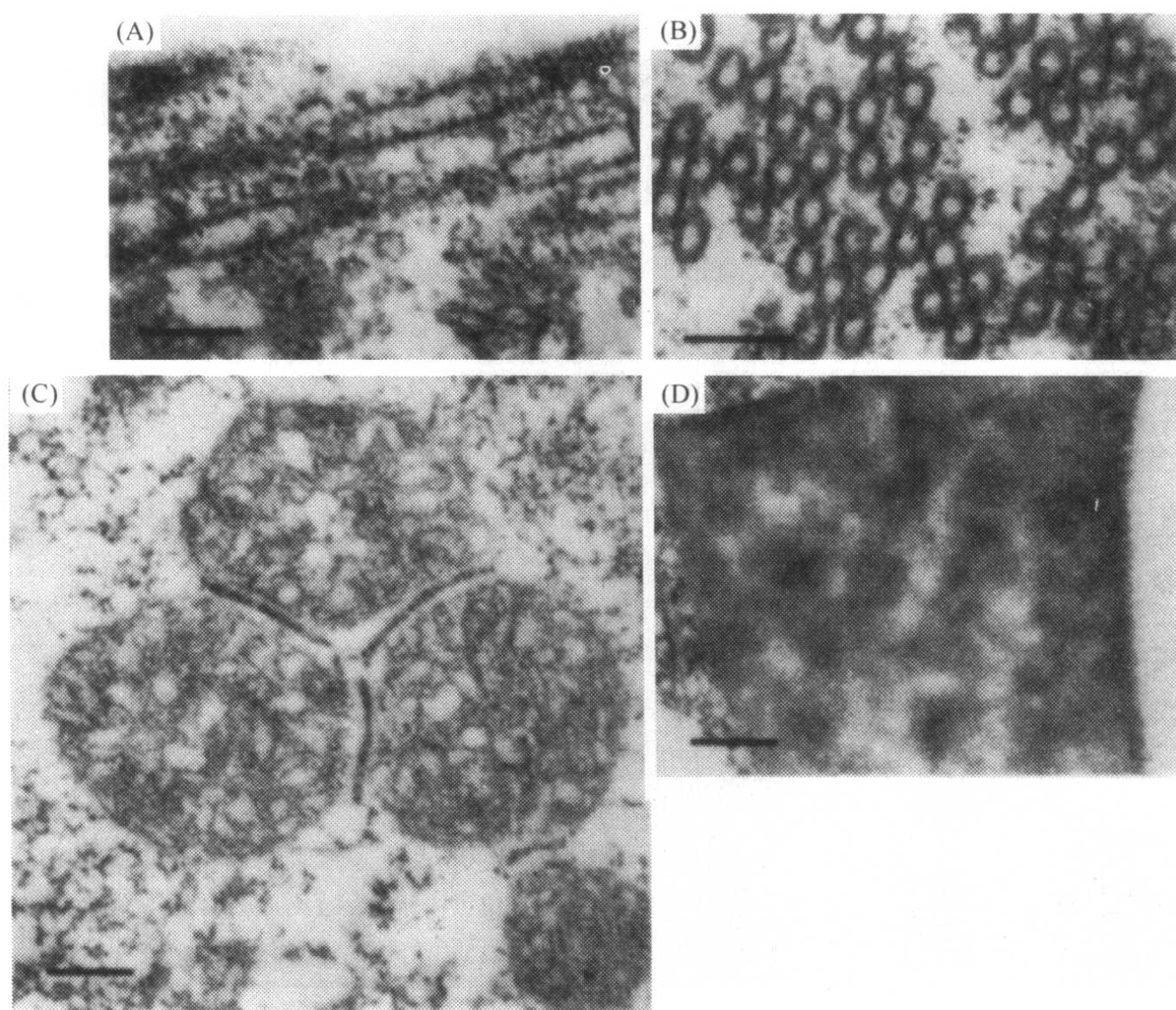


图 3.9　感染 BBWV-1［当时称为碧冬茄环斑病毒（petunia ringspot virus)］的克利夫兰烟（*Nicotiana clevelandii*）叶片的超薄切片的电子显微照片。(A) 和 (B) 由病毒粒体组成的管状结构的纵向和横向切片；(C) 在线粒体间排列的病毒粒体；(D) 病毒粒体的晶体。标尺 ＝ 250 nm；承蒙版权所有者（Karger，Basel）惠允，引自 Hull 和 Plaskitt (1974)。

e. 呼肠病毒和弹状病毒

呼肠病毒科和弹状病毒科病毒感染的植物细胞通常含有大量的病毒粒体，粒子在细胞质中排列有序。对一些弹状病毒而言，病毒粒体在核周围空间中以比较有规律的排列方式发生聚集（图 8. 19）(Francki *et al.*，1985d)。

2. 风轮状内含体（Pinwheel inclusion）

马铃薯 Y 病毒科病毒在寄主的细胞质中产生典型的圆柱状内含体（Hiebert and McDonald，1973）。这类内含体最为典型的特征是：从横切面观察，可见一个中心管连接着放射状向外伸展的、弯曲的“手臂”，看上去很像风轮（pinwheel）。将连续的切片重构便可发现内含体由一系列片层和周期率为 5 nm、带有精细条纹结构的卷筒组成。从切面上观察到的束、圆柱、管和风轮都是复杂的几何结构的表现。内含体的总体结构需通过冷冻蚀刻法进行确认（McDonald and Hiebert，1974），也可利用倾斜台结合计算机辅助的解析几何来确定内含体结构（Mernaugh *et al.*，1980）(图 3. 10)。对某些马铃薯 Y 病毒科病毒来说，风轮状内含体卷曲得很紧，而其他则比较松弛。同组中不同成员产生的内含体在各种细节上差别很大。

通过激光共聚焦扫描显微镜观察到的 ZYMV 细胞质内含体的三位结构呈线状纤维结构，其厚度和长度不等（Lim *et al.*，1996）。平均长度的变化范围为$(9.4 \pm 0.3) \sim (20.1 \pm 0.4)\mu m$，宽度范围为$(2.1 \pm 0.1) \sim (3.7 \pm 0.1)\mu m$。

风轮状内含体产生并附着于质膜中胞间连丝的位点上（Lawson *et al.*，1971；Andrews and Shalla，1974）。风轮状内含体的中心管位于胞间连丝上，而且质膜从一个细胞到邻近细胞很可能是连续的。随着内含体的增大，中心和片状结构伸展至细胞质内。在侵染后期，内含体可能从质膜上脱落并游离于细胞质中。病毒粒体总是紧密地附着在风轮状内含体的臂上，在侵染早期如此（Andrews and Shalla，1974）。内含体中存在的病毒编码的蛋白质将在第 6 章（第Ⅷ 节 C）讨论。

3. 花椰菜花叶病毒内含体

在 CaMV 和其他花椰菜花叶病毒属病毒（caulimoviruses）感染的植物细胞质中已经发现了两类内含体（也称病毒质，viroplasm）（图 8. 23）；在近缘的杆状 DNA 病毒属病毒（badnaviruses）侵染的植物细胞中未观察到类似的内含体。这两类内含体都含有病毒粒体。电子致密（electron-dense）型内含体由 ORF Ⅵ的产物构成，据认为是病毒合成与装配的场所（参见第 8 章第Ⅶ 节 B. 2）。电子透明内含体由 ORF Ⅱ 的产物构成，该产物是一种参与蚜虫传播的蛋白质（参见第 11 章第Ⅲ节 F）。

D. 类似于病毒诱导的细胞学结构

细胞中的一些正常结构会被误认为是病毒感染的结果。如质体中的结晶质或与膜结合的内含物（Newcomb，1967）。叶绿体中的前片层体从切面看呈规则排列的管状结构，这些前片层体可通过某些化学处理诱导产生。

在缺磷的菜豆叶片中，叶绿体中会发生降解变化（Thompson *et al.*，1964），这一点与有些病毒侵染的结果很相似。同样，在缺硫的玉米叶片的叶绿体中，含有许多嗜锇

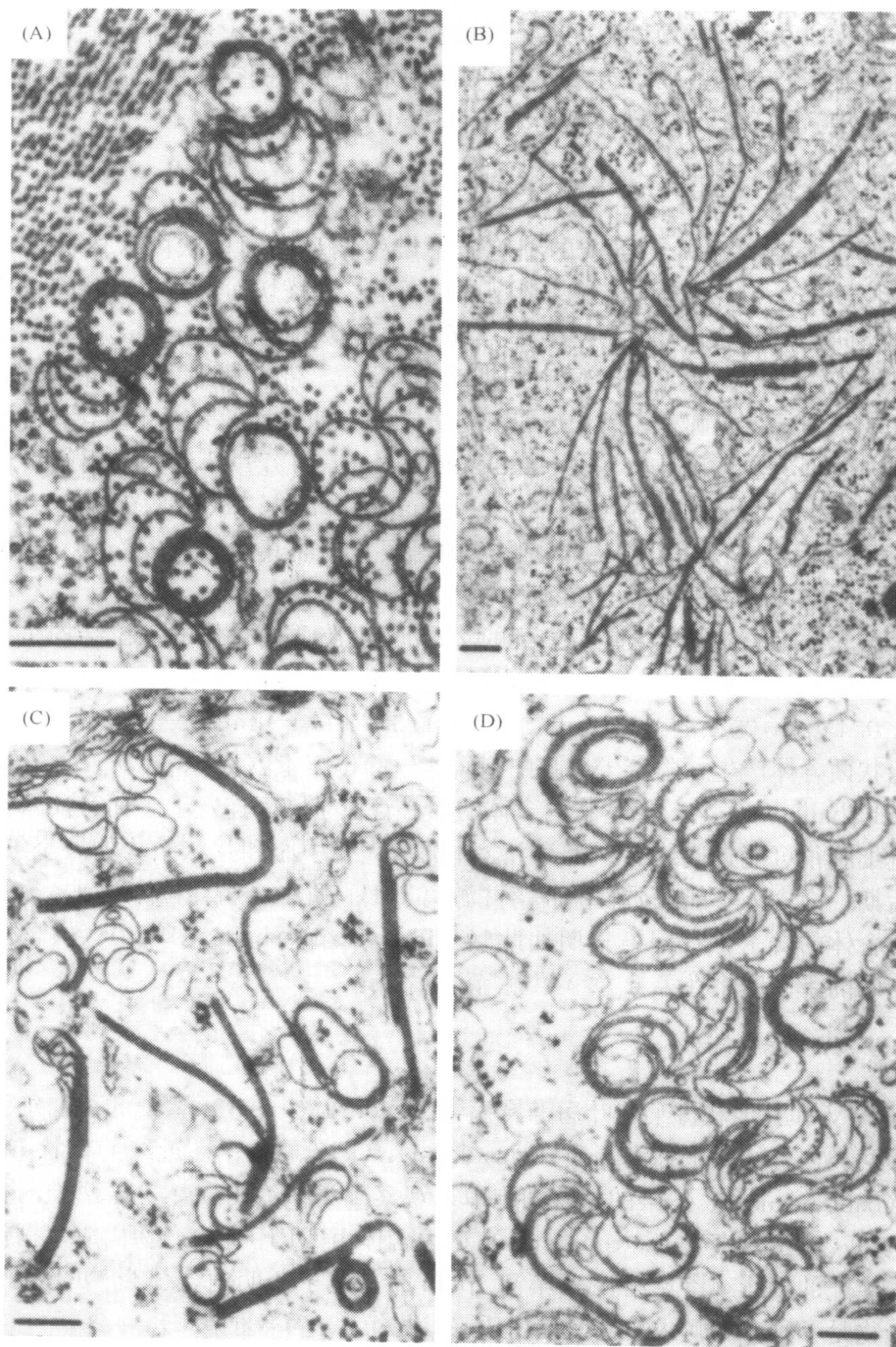


图3.10　Edwardson (1974a) 和 Edwardson 等 (1984) 对细胞质内含体的形态变化的分类。(A) 由未明确鉴定的一种茄子上的分离物诱导形成的卷筒状 (scroll) 内含体 (在尼日利亚发现)；(B) 昆诺藜上由匙叶草 Y 病毒 (statice virus Y) 侵染所形成的薄片聚集体状 (laminated aggregate) 内含体；(C) 克利夫兰烟上由 TuMV-O 株系侵染所形成的卷旋状和薄片状内含体；(D) PVY 侵染普通烟后形成的卷旋状和短的、弯曲的薄片状内含体。标尺=200 nm；经允许，引自 Lesemann (1988)。

小球和小泡 (vesicle) (Hall *et al.*, 1972)。

C4 植物的维管束鞘叶绿体外围含有无数的小液泡（vacuole），这些液泡在 C3 植物的某些组织中也存在（Marinos，1967）。在柳叶菜（*Epilobium hirsutum*）的天然质体突变体中，通过电镜可观察到退化的基粒和突变质体的液泡化（Anton-Lamprecht，1966），这与 TYMV 侵染大白菜造成的病理学变化很相似。

健康细胞的核有时也含有晶体结构，这些结构可能会被错认为病毒的内含体（Lawson *et al.*，1971）。

病毒侵染可导致膜系统的破坏、大量嗜锇微粒的出现和器官的解体，这些和衰老或其他因子所引起的正常的退化过程相似。

E. 讨论

病毒侵染可引起三种主要的细胞学变化。第一，细胞组分受到影响。有时侵染的影响是主要的，病毒诱导叶绿体等细胞器发生明显的结构变化，甚至是内部成分降解而导致细胞死亡。这些变化通常在症状的形成过程中具有一定作用。病毒侵染也会对细胞产生许多次要的和短暂的影响。在第 13 章中将对一些涉及病毒复制和表达的物理论加以叙述。第二，经常存在病毒粒体的聚集体。正如后续各章所述，病毒可经历多个复制循环，如果复制以一种失控的方式进行则会导致细胞死亡。因此，病毒的聚集可能是使其离开复制池的一种机制。第三，病毒基因产物的积累。CaMV 的 ORF Ⅵ编码的内含体是病毒表达和复制的场所。然而，ORF Ⅵ产物的反式激活特性（参见第 7 章第Ⅴ节 B. 7）可能会对细胞的正常功能有不良作用。因此 ORF Ⅵ蛋白的聚集可能是其与细胞成分相隔离的一种机制。同样，马铃薯 Y 病毒科病毒基因组通过多聚蛋白策略表达，多聚蛋白产生许多拷贝的蛋白酶和复制酶分子（如同外壳蛋白分子一样）。蛋白酶和复制酶可能对细胞有毒害作用，因而它们存在于内含体内。

第Ⅴ节　病毒的寄主范围

20 世纪早期，植物病毒学家就已尝试利用寄主范围作为病毒鉴定和分类的标准。在一个典型的实验中，被研究的病毒需要通过机械方式接种到一些植物上，然后观察类似病毒病症状的发展。判断隐症侵染是通过回接到已知可发病的寄主上完成的。通过回顾我们便可发现，依赖于这些程序所获得的对病毒寄主范围的认识过于简单。在过去几年中，我们对“侵染”的理解已经相当明晰，揭示了一种植物作为某种特定病毒的寄主或非寄主的某些可能的分子机制。

“寄主”（host）这一术语有时使用得比较模糊，从技术上讲，可将其定义为“可供病毒在其中复制的生物或细胞培养物（cell culture）”。这意味着病毒只要能在最初侵染的细胞中复制（即阈下侵染，subliminal infection），就可认为这种植物是该病毒的寄主。然而，这种定义是不实用的。在本书中病毒仅局限于接种叶内的某种植物称为局部寄主（local host），而病毒可由接种叶扩散到其他部位（并非是植株的所有部位）的植物称为系统寄主（systemic host）。有关病毒与植物相互作用的详细内容将在第 10 章中讨论。

A. 寄主范围研究的限制因素

1. 概述

迄今为止，几乎所有的已描述的植物病毒侵染的植物范围都限于被子植物。只有一小部分可能的病毒-寄主组合是经过实验证实的。如下的计算即显示出我们的认识范围还十分有限。Horváth (1983a) 在 456 种被子植物上测试了 24 种病毒的寄主范围，他发现了 1312 种新的病毒/寄主组合，即他所证实的新组合为可能的组合总数的 12%。但是已有记录的被子植物大约有 250 000 种 (Heywood，1978)，植物病毒有 900 多种。如果将 12%的比例引入这一范围的话，那么至少还有 25×10^6 个亲和性的寄主-病毒新组合有待于发现。与这个数字相比，已经测试的组合的数目显然是微不足道的。

我们对病毒在各种植物上的发生与分布的了解是支离破碎的，而且结果存在一定的误差，其中有 4 个可能的原因。

首先，当田间发生病毒病时，植物病毒学家开始关注的是那些引起栽培植物重大经济损失的病毒。他们对其他植物的兴趣一定程度上是因为病毒可以在这些植物上保存，或者病毒的介体可危害这类植物。因而，直到最近所有已知的植物病毒都只限于被子植物。在此范畴内，大多数已知的病毒寄主都是农业或者园艺植物，或者是生长于栽培地的野生杂草。

世界人口所需的多数食物来源于 12 种植物（3 种禾谷类：水稻、小麦和玉米；两种糖类植物：甜菜和甘蔗；3 种块茎、块根类作物：马铃薯、甘薯和木薯；两种豆类：菜豆和大豆；两种树类植物：椰子和香蕉）。在 ICTV 公认的 977 种病毒中，有 87 种病毒的名称来源于 12 种寄主植物。已记录的被子植物约 250 000 种。因而，约有 9%已描述的植物病毒源于占植物总数 0.005%的种类。番茄和烟草可作为另一种例子，这两类作物以每公顷产值计算具有很高的商业价值。名称中包含烟草和番茄的病毒有 55 种，分类地位较低的物种在商业上应用很少。因此，在这类物种上发现的第一个病毒来自于栽培的蘑菇上就不足为奇了。

我们对于病毒认识局限性的第二个原因更属于推测性的。现在看来，病毒病在植物上的广泛发生和严重危害很大程度上是人类农业操作造成的。在自然条件下，病毒很可能已经被寄主植物所适应，引发明显病害的可能性就小得多。因此，偶尔对生长于自然产地的植物进行检查，一般不会发现病毒存在的迹象。通过机械传播和可能的无脊椎介体接种试验对大量同种类的植物进行测试，需耗费大量的时间和精力。已经完成系统测试的种类极少。

第三，用于病毒测试植物的标准选择很大程度上受一些因素制约，即这些植物是否易于在温室中生长，是否易于通过机械方式或介体进行传毒操作。

第四，用于病毒寄主范围研究的植物的属和种不能在分类学上平衡选择。Watson 和 Gibbs (1974) 指出，在北温带工作的病毒学家大多会选择类羊茅 (festucoid) 草用于寄主范围的研究，而在世界上的其他地区，非类羊茅草在植物区系和农业重要性上占主要地位。

2. 技术因素

确定植物病毒的寄主范围还存在许多技术上的难点和陷阱。有关诊断的内容将在第15章（第Ⅱ节）讨论。关于机械接种应用的其他可能的局限性现以类病毒 PSTVd 的相关实验加以阐述。机械接种实验表明，无茎薯（*Solanum acaule*）的一个变种对 PSTVd 似乎是免疫的。然而，通过农杆菌介导接种该植物后，该类病毒可在植株中系统复制，这与嫁接感染类病毒的番茄的结果相同（Salazar *et al.*，1988b）。

B. 寄主范围的型式（pattern）

尽管存在前述的局限性，我们还是可以得出总的要点。不同病毒的寄主范围差异很大。一个极端的例子就是 BSMV，其自然寄主仅限于大麦。其他病毒如 CMV、AMV、TSWV、TMV 和 TRSV 的寄主范围就十分广泛。例如，TSWV 的寄主多达 12 个科的 925 余种植物，CMV 感染多于 85 个科的 1000 多种植物。

有时一种病毒的寄主范围完全处于另一种与其明显无关的病毒的寄主范围之内。Holmes（1946）因此发现，在 310 种供试植物中，有 83 种对 TMV 和 TEV 都感病，116 种仅对 TMV 感病，没有一种仅感染 TEV 而不感染 TMV，有 111 种对两者都不感病。在症状反应上也存在很大差异（表 3.3）。

表 3.3　TMV 和 TEV 的寄主范围及其寄主的症状反应

TMV	定位	症状的有无	TEV
111[a]	免疫/阈下侵染	无症状	227
100	局部	无症状	15
15	系统	无症状	8
27	局部	有症状	7
57	系统	有症状	53

注：a. 寄主种类的数目；经允许，数据引自 Holmes（1946）。

Bald 和 Tinsley（1970）发现 8 个可可病毒分离物的寄主范围既相互包含又存在差异。毒性最强的分离物可感染 26 种供试植物中的 21 种，而且其寄主范围包括了其他 7 个分离物的寄主范围。

Bald 和 Tinsley（1967）对早期工作者的数据进行了统计分析，发现存在这样一个趋势：与系统发育上低等的植物群体比较，系统发育上高等的群体中对病毒敏感的植物种类占的比例较大。一般来讲，在病毒的田间寄主同科或者近缘科中，可被病毒侵染的植物种类的比例高于亲缘关系较远的科中感染病毒的植物比例。

C. 寄主范围的决定子（determinant）

为什么有的病毒能侵染一种植物而不能侵染另一种植物？从前述的生物学和统计学中，我们还无法获知其中的原因。对此问题，我们需要已有的生化、分子生物学和遗传学方面的信息。病毒基因组中极小的变化便可影响寄主范围，这一点是毋庸置疑的。例如，Evans（1985）描述了 CPMV 的一个亚硝酸突变体，该突变体不能在豇豆中生存，

其但是可在菜豆中生存。其突变发生于B-RNA中。

我们根据现有的知识基础可发现，从病毒侵染到植物系统发病的过程中，病毒的病害循环可能在4个阶段被阻断：① 初始事件期间——脱壳阶段；②最初侵染细胞中起始复制期间；③病毒自第一个细胞（病毒在其中复制）移动期间；④激发最初侵染区域中的寄主细胞的防卫反应期间。这些阶段将在下面依次讨论。寄主范围决定子的分子方面的情况在第9章和第10章中讨论。

1. 初始事件

a. 适宜的寄主细胞和细胞器的识别

细菌病毒和侵染脊椎动物的多数病毒在其表面含有特殊的蛋白质，这类蛋白质可识别感病寄主细胞表面的蛋白受体。植物弹状病毒、呼肠病毒和番茄斑萎病毒属病毒的表面蛋白具有这种细胞识别功能。这种功能在植物上不太可能发挥作用。例如，将LNYV病毒粒体的外膜用去垢剂去除后，病毒仍有侵染活性（Randles and Francki，1972）。然而，G蛋白表面的突起（图5.40）对介体昆虫膜的识别可能非常重要。植物呼肠病毒的表面蛋白的确具有识别介体昆虫的作用。尚无证据表明有任何一种单链RNA病毒表面存在着植物细胞识别受体；然而，RNA病毒表面存在着可与其生物介体发生循环型相互作用的受体（参见第11章第Ⅲ节H.1.a）。来源于这些小型病毒的证据表明：寄主范围通常是RNA而非蛋白质外壳的一种特性。对此进行验证即可发现，无论是将完整的病毒还是RNA作为接种物，该植物病毒的寄主范围是相同的。通过侵染性RNA而非病毒进行超越寄主范围的尝试通常是不能成功的。Hiebert等（1968）证实，由BMV外壳蛋白与CCMV RNA组成的人工杂交的雀麦花叶病毒属病毒粒体仍然可以侵染对BMV免疫的豇豆。该杂种病毒不能侵染BMV的自然寄主大麦。

这些试验和其他类似的试验表明，病毒RNA的寄主范围不能通过将其包装于可侵染某种寄主的病毒的蛋白质内而得到扩展。Atabekov等（1975）研究了多个“杂种”病毒的寄主范围，发现异源外壳蛋白限制了寄主范围。包装于TMV外壳的BMV RNA不能侵染其正常寄主（Atabekov *et al.*，1970a）。总而言之，外壳蛋白在细胞识别过程中所起的作用很小，这种观点已有事实证明，即接种后的病毒脱壳看起来并非是寄主特异性的（见下面部分）。表面识别蛋白在病毒侵染植物的过程中所起的作用可能很小，因为病毒需通过植物表面的伤口进入细胞。

通过显微针可将多种病毒直接注入叶片绒毛细胞以对其进行侵染（参见第9章第Ⅱ节b），这大概是绕过了病毒-细胞表面之间的任何互作的缘故。同样，完整的病毒或其他侵染性材料能够通过胞间连丝在细胞之间移动，当其在质膜内停留时便可造成侵染（参见第9章第Ⅱ节）。

根据各种聚集状态下利用模拟膜与植物病毒外壳蛋白进行的实验，Datema等（1987）认为不会发生疏水脂类-外壳蛋白的相互作用。豇豆原生质体对CCMV的结合与摄取实验不能证明病毒的内吞摄取作用由特异性受体所介导（Roenhorst *et al.*，1988）。

如第8章所述，多种病毒的复制阶段需在特定的细胞器内进行。细胞内经常进行着病毒（或者一些亚病毒组分和产物）对细胞内的特定细胞器或位点的识别。植物病毒可能已经进化出一套识别系统，这套系统有别于病毒在液态基质中或者质膜表面与其寄主

细胞的正常相遇和识别。

b. 脱壳过程缺乏专化性

多方面的证据表明，脱壳过程中不存在寄主专化性或者存在的可能性极小。对于TMV（Kiho *et al.*，1972）和TYMV（Matthews and Witz，1985）而言，病毒在非寄主（non-host）与寄主中都很容易脱壳。Gallie等（1987c）发现，当编码氯霉素乙酰转移酶的mRNA被包入带有TMV外壳蛋白的杆中并接种植物叶片原生质体后，RNA便发生脱壳。Francki等（1986b）将VTMoV和类病毒PSTVd共同接种一种感病寄主，发现类病毒已被整合到病毒粒体之中。将此整合后的病毒接种特定的类病毒寄主，仅发生类病毒的侵染，这表明核酸已经被脱去蛋白外壳。然而，此实验不能排除VTMoV仅在其非寄主的初始受侵染细胞中复制的可能性。

2. 复制

TMV接种非寄主植物后，在多核糖体中发现了病毒RNA（Kiho *et al.*，1972）。此外，TMV粒子可在爪蟾（*Xenopus*）卵母细胞中脱壳并表达病毒的RNA（P. C. Turner *et al.*，1987）。然而，一些证据表明：参与复制的特定病毒基因也可作为寄主范围的决定子。某些病毒的复制复合体中已发现了多种寄主蛋白（参见第8章第Ⅳ节E.5和第Ⅳ节H.5）。TYMV的复制酶含有病毒编码的115 kDa多肽和可能源于寄主的45 kDa亚基，对此Mouches等（1984）和Cresse等（1986）已获得了相应的证据。各种芜菁黄花叶病毒属病毒的115 kDa多肽的血清学变异很大。这说明病毒编码的多肽为了形成功能性的复制酶，需要对不同寄主中的寄主亚基进行特异性识别，这就导致115 kDa多肽出现大的血清学变异。因此，病毒编码的多肽可能直接参与对寄主特异性的确定。

CaMV的多数株系都只能侵染十字花科植物，侵染茄属的少数株系可根据其寄主种分为3种类型。为了明确CaMV的哪些基因决定寄主范围，Schoelz等（1986）通过将不同株系的DNA片段交换制造重组病毒，然后将这些重组体接种相应的茄属植物。结果表明：基因Ⅵ的前半部分，即编码内含体蛋白的区域（参见第6章第Ⅳ节A.1.B.），决定了病毒是否可对曼陀罗和毕氏烟（*Nicotiana bigelovii*）进行系统侵染。

美国发生的南瓜卷叶病是由两种不同但高度同源的双生病毒造成的，其中一种病毒的寄主范围处于另一种病毒的寄主范围之内（Lazarowitz，1990）。用农杆菌侵染法接种叶盘实验表明，病毒复制与其中一种病毒的寄主限制有关。受限制病毒的复制通过与不受限制病毒共同接种而被反式激活。序列分析表明，受限制病毒在共同区域中有13个碱基的缺失。两个共同域的其他部分基本相同。Lazarowitz（1990）认为碱基的缺失与寄主范围的限制有关。

正如在第7章第Ⅴ节B.9讨论部分所描述的，有些病毒可以合成“通读”蛋白质。通读能否成功依赖于寄主植物中一种合适的抑制型tRNA的存在。对那些依赖通读策略的病毒来讲，这类tRNA的存在至少可被视为寄主范围的决定子之一。

3. 细胞间移动

拥有亲和性和功能性的细胞间移动蛋白是决定特定病毒能否易于在特定寄主或品种

中进行复制的因素之一，对此已有两类强有力的证据支持。

首先，第 9 章中介绍的实验表明：许多病毒含有编码细胞间移动蛋白的基因。早期研究表明，病毒通常不能通过叶柄或茎部的切口感染叶片。然而，Taliansky 等（1982a，b，c）证明，如果上部叶片已经被一种辅助病毒侵染，那么溶液中的病毒便可进入并对其进行侵染。这种情况发生于那些丧失移动功能的突变体上，不能对某种寄主进行自然侵染的病毒也存在这种现象。例如，在经过 TMV 预侵染的番茄植株内，BMV 可在输导组织内运动，然而番茄却不是 BMV 的自然寄主。同样的情况也发生在被注入已感染 BSMV 的小麦中的 TMV 上。甘薯的田间感染似乎也存在类似情形，感染 SPFMV 的甘薯可被 CMV 侵染（Cohen *et al.*，1988）。因而，当一种明显的非寄主抗性是由于移动功能阻断而出现时，如果此特定寄主被与之亲和的含有移动蛋白的病毒预先感染，抗性则会被克服，这已是一种普遍现象。然而，解释那些涉及两种或更多病毒共同侵染的现象时，必须要注意其中一种病毒可能抑制植物的防卫系统（参见第 10 章第Ⅳ节 H 部分）。

第二类证据是有关细胞间移动对于寄主范围的重要性方面的。许多病毒接种某种植物后，叶片上并不表现可见的宏观症状，但是病毒却可感染来源于这些叶片的原生质体并在其中进行复制。例如，Beier 等（1977）尝试用 CPMV 机械接种 1031 个豇豆品系。其中 65 个品系被确定为可利用的免疫品系，因为这些接种植株没有发病，而且没有从中分离出病毒 。免疫品系中有 55 个可制备原生质体，其中的 54 个能被 CPMV 侵染。类似结果在其他的病毒和寄主上也曾出现。

Sulzinski 和 Zaitlin（1982）用 TMV 机械接种豇豆和棉花，他们每隔一段时间分离原生质体并利用荧光抗体确认各时间段被感染细胞的比例。每 $5\times10^4\sim15\times10^4$ 个原生质体中有 1 个被感染，且此数目至少在 11 天内保持不变。这些结果表明：植物受病毒的阈下侵染后，仍可维持病毒在单个细胞中的复制，但是病毒不能自初始侵染细胞中移动出来。如本节 A 部分所述，被辅助病毒诱导侵入寄主并进行系统复制的病毒，可能也会以类似阈下侵染方式侵染相关的寄主。对 BGMV 的观察便可支持此观点，BGMV 通常局限于韧皮部组织，但在受 BGMV 和 TMV 双重感染的菜豆叶片中，BGMV 可进入多种类型的细胞中（Carr and Kim，1983）。

然而，并非移动蛋白中的所有序列差异都与寄主范围有关。Solis 和 García-Arenal（1990）认为，TMV、TMGMV（烟草花叶病毒属的另一种病毒）和 TRV 移动蛋白的主要差异在 C 端区，然而这 3 种病毒的自然寄主是相同的茄科植物。

功能性的细胞间移动蛋白并非是病毒进行系统性移动的唯一条件。CCMV 侵染双子叶植物（豇豆），而相关的 BMV 却在单子叶植物（大麦）中复制。这两种病毒却都可以在这两种寄主的原生质体中进行复制。如果移动蛋白是控制系统移动的唯一因子，那么在两种病毒间交换 RNA 3 就可改变其寄主范围。然而事实并非如此。因此，系统性移动因子还应包括 RNA 1 或 RNA 2 的产物，或者二者的产物均在其内（Allison *et al.*，1988）。由于 BMV 必须经过包被才能系统移动，因此可能其所有 4 个基因均参与系统移动及寄主专化性。

4. 寄主细胞防卫反应的激活

在一些寄主-病毒的组合中，病毒激活寄主的防卫机制也是限制病毒复制及其由初始侵染细胞向周围细胞移动的一个因素；结果是形成局部斑，未发生系统扩展。这种使得植物可以抵抗病毒的现象将在第 10 章的第Ⅲ节进一步讨论。寄主防卫系统的其他方面将在第 10 章的其他部分加以讨论。

5. 影响寄主范围的寄主基因

无论结果如何，接种后病毒和寄主细胞之间发生的一切相互作用之中必定有寄主基因的参与。病毒的侵染受到特定的寄主基因的限制而产生局部枯斑，这方面的研究较为详细。第 10 章的第Ⅲ节中会对此进行讨论。

6. 总结

关于病毒寄主范围的分子基础，现有的证据表明：① 通常不存在病毒-植物寄主细胞受体识别系统，初始脱壳阶段中寄主特异性存在的可能性很低。② 在某些植物-病毒的组合中，病毒在初始侵染细胞中的复制过程中，其中的某些阶段可能存在着阻断病毒的分子机制。这些构成了对侵染真正免疫的基础。③ 在某些植物-病毒的组合中，病毒仅能在初始受侵染细胞中复制而不能移动到这些细胞之外，这是因为病毒的运动蛋白和某些寄主细胞结构之间不相配。这种情况可导致阈下侵染，从应用角度看，就是出现了抗病毒品种。④ 在其他寄主-病毒的组合中，病毒由初侵染细胞向邻近细胞的移动会被寄主的反应所限制，因而产生“局部斑寄主”，在应用方面就是指“田间抗性”。基于这些观点，表 10.1 定义了寄主对病毒接种表现出的不同反应类型。

第Ⅵ节　讨论和总结

对所有病毒而言，侵入健康寄主植物个体的能力对于其存活是至关重要的。病毒自身不能进入未受损伤的植物表面。对此，每种病毒都已进化出可绕过或克服此屏障的途径。病毒可经花粉、种子或植物体（营养繁殖）以高频率逐代繁殖，这使得病毒不必进入植物表面。

多种植物病毒可通过无脊椎动物或真菌介体传播，这些介体在取食或者侵染过程中穿过植物表面，与此同时将具有侵染性的病毒带入植物细胞中。第 11 章将对此进行讨论。

机械传播是指具有侵染能力的病毒凭借植物表面的微伤口进入植物细胞内。对多个病毒组而言，如果条件适宜，侵染便可发生。机械接种是一个非常重要的实验病毒学方法。在田间，除了烟草花叶病毒和马铃薯 X 病毒这类没有其他传播途径的少数病毒属之外，很难想像机械传播的重要性。然而，一些生物介体未知的病毒也可通过此方式传播。由于这些病毒相当稳定，而且在受侵染叶片中浓度很高，因此它们也就适应了这种传播方式。当邻近植物的叶片互相摩擦或者根部相互接触时，上述特征使病毒得以传播。

一个病毒粒体成功进入细胞后就足以对一株植物进行侵染，这是可能发生的。但是在正常情况下，多个病毒粒体可进入一个细胞。在初始受侵染细胞中进行复制后，病毒会通过胞间连丝向邻近细胞移动，这是个相当缓慢的过程。随后病毒进入维管组织，通常是韧皮部，在这类组织中的移动是相当迅速的。大多数病毒都会编码特异的基因产物，这类产物对于病毒由初始受侵染细胞中移出以及扩散至整个植株是必需的。

病毒在植株中的最终分布可能是很不均衡的。有些寄主-病毒的组合中，病毒的移动仅限于局部枯斑。在其他组合中，有些叶片可能不被感染，而就花叶病而言，深绿色岛中含有少量病毒或者没有病毒。有些病毒局限于特定的组织内，如黄症病毒属，该属病毒仅存在于韧皮部中。有些病毒可进入顶端分生组织中正在分裂的细胞内。其他病毒似乎不具备这种能力。

已有明确的证据证实：病毒粒体和侵染性的病毒 RNA 均可在细胞间移动，但并非所有病毒都以此形式移动。TMV 是以由病毒 RNA、病毒编码的一些蛋白质和某些寄主成分组成的核蛋白复合体的形式在植株内移动的。病毒移动蛋白可能通过改变胞间连丝的性质而使病毒易于通过。但这一点尚未被证实（病毒的移动将在第 9 章讨论）。

病毒寄主范围的分子基础尚不完全清楚。就大多数植物病毒而言，完整的粒体不能识别适于其复制的寄主细胞。病毒核酸在寄主和非寄主中均可脱壳。在病毒复制过程中，尚未发现限制寄主范围的特定阶段。然而，已有的证据表明：在某些病毒的非寄主中，病毒仅在初始受侵染细胞中复制而不能移动至邻近的细胞。这是因为在此特定植物中，病毒编码的胞间移动蛋白不能行使其功能。就实际用途而言，这样的植物对该种病毒具有抗性。如同第 10 章第Ⅳ节所述，植物拥有抵抗“外源”核酸的普通防卫系统，此系统可被侵染该植物的病毒所抑制。寄主防卫系统和病毒防卫抑制系统之间的相互作用很可能是寄主范围与症状表达的主要决定因子。

第 4 章　植物病毒的提纯及组成

第Ⅰ节　导言

为了研究病毒粒体的基本性质，通常有必要将其从细胞组分中分离出来。自从Stanley（1935）、Bawden 和 Pirie（1936，1937）以及 20 世纪 30 年代其他人所从事的杰出研究工作以来，病毒学家已投入了大量的精力以建立植物病毒的分离和提纯方法。获得保持侵染性的提纯制剂对于研究病毒的基本特性尤为重要。首先被分离和研究的病毒（TMV、PVX 和 TBSV）都相当稳定且在寄主中浓度非常高，这是不足为奇的。今天，病毒学家的研究兴趣已经拓展到那些在寄主中浓度变化很大而且在各种理化环境中稳定性存在显著差异的一系列病毒。

本章将分析病毒纯化过程中需要考虑的因素，同时讲述病毒粒体的基本组分。

第Ⅱ节　分离

病毒的提纯并无通用的规则。对一种病毒有效的分离程序可能对另一种明显相似的病毒没有效果。即便是同一病毒的不同株系，可能也需要不同的程序才能将它们有效地分离。

在植物病毒的研究中，已有大量文献引入了纯度（purity）和同质性（homogeneity）的概念。从化学角度讲，还没有一种像提纯的植物病毒制剂那样的物质。即使一种制剂中绝对不含有低分子质量或高分子质量的寄主组分（大多数情况下这是不可能的），但是还要考虑其他的因素。

（1）多数制剂通常是侵染性和非侵染性病毒粒体的混合物，而后者的核酸分子可能在一处或多处（不同粒子中的不同位置）发生断裂。

（2）即使亲本株系在制剂中占有绝对的比例，多数病毒制剂通常由不同突变体的混合物组成。这类突变体在 RNA 或 DNA 碱基序列上至少有一个位置存在差异。如果突变发生在外壳蛋白顺反子中，则此突变体可能不同于亲本株系。

（3）许多病毒的提纯制剂含有一种或多种不完整的、无侵染性的粒子。

（4）病毒蛋白和核酸分子中的带电基团会吸引一些离子与其结合。提纯病毒制剂中含有的无机的和小的有机阳离子很大程度上取决于缓冲液和分离病毒时使用的其他化学品的性质。

（5）一些较大的病毒看来具有多种大小不同的侵染性粒子。

（6）在分离过程中，病毒粒体的比例可能以某种方式发生改变。外壳蛋白可能受到酶类的攻击，例如，菜豆（*Phaseolus vulgaris*）提取物含有一种可去除 TMV 末端苏氨酸的、与羧肽酶类似的酶（Rees and Short，1965）。在病毒的提纯过程中，特定位点上发生的蛋白水解作用可产生一系列比原来小的外壳蛋白分子（如 SNMoV，Chu and

Francki, 1983; BaYMV, Ehlers and Paul, 1986)。叶片中的酚类氧化时，外壳蛋白可能会发生化学修饰（Pierpoint *et al.*, 1977)。较复杂的病毒，如呼肠病毒科病毒（reoviruses)，在分离期间可能会丢失部分结构（Hatta and Francki, 1977)。

因此，对植物病毒而言，纯度和同质性这类术语是由特定病毒和所用的提纯方法界定的。如果病毒粒体中存在的杂质和变异不影响对某些特性的研究，或者实验中已经对此加以考虑，那么就可以认为，该病毒制剂对于此特定目的而言是纯的。现已建立了多种植物病毒的有效分离程序，此处不再详述，只对病毒分离中的相关问题加以概括。从大量的文献中可查阅到许多病毒的详细分离程序，Hull (1985)、Walkey (1991)、Stace-Smith 和 Martin (1993)、Dijkstra 和 de Jager (1998) 以及 Foster 和 Taylor (1998) 的著作中有多个章节对此进行了论述。

A. 植物材料的选择

1. 测试寄主

当建立病毒提纯程序时，对各组分进行侵染性测定是十分重要的。当然最好选用局部斑寄主。通常在预试验中精确度无需太高，可靠的、发展速度快的局部斑显然具有明显的优势。如果没有可用的局部斑寄主，那么必须在系统寄主上进行测定试验。对那些不能机械传播的病毒，有时可通过介体昆虫接种的方法进行侵染性测定。病毒提纯后，可通过电子显微镜、斑点印迹（dot blot）ELISA 或核酸杂交（前提条件为有适宜的抗血清或探针）进行检测。

2. 繁殖寄主

繁殖寄主的选择对于成功分离病毒是非常重要的。选择繁殖寄主时需考虑多种因素，包括如下要点：

(1) 寄主植物应该易于生长，最好是来源于种子。然而，所用种子不应携带通过种子传播的病毒，如 SoMV（在藜属上的种传率很高)。

(2) 病毒在寄主中的浓度应该很高。

(3) 寄主中不应含有大量的具有抑制作用或使病毒发生不可逆沉淀的物质，其中包括酚类物质、有机酸、黏液和胶质，特定的蛋白质和酶类（尤其是核糖核酸酶)。例如，多种核果类病毒很难从其自然寄主中分离出来，因为大多数蔷薇科植物的叶片中含有高浓度的丹宁酸。其他非蔷薇科寄主，如黄瓜（*Cucumis sativus* L.)，可使一些核果类病毒得以成功分离。

(4) 提纯过程中，寄主组分应易于与病毒分离。以某些豆类为例，如直生刀豆（*Canavalia ensiformis*）含有大量的核酮糖 1，5-二磷酸羧化酶-加氧酶（ribulose-1，5-bisphosphate carboxylase/oxygenase，Rubisco）大亚基（蛋白组分 1)，在提纯过程中该酶通常以一种聚集态与杆状病毒混在一起。

在实践中，藜属（*Chenopodium*)、香瓜属（*Cucumis*)、烟草属（*Nicotiana*)、碧冬茄属（*Petunia*)、菜豆属（*Phaseolus*）和豇豆属（*Vigna*）植物适合用作多种病毒的繁殖寄主。

应该选择合适的植物品种、生长条件和收获时间以保证侵染性病毒的起始浓度达到

最高水平。对多种病毒而言，病毒浓度在几天或数星期之后达到最高，随后便快速降低（图 4.1）。

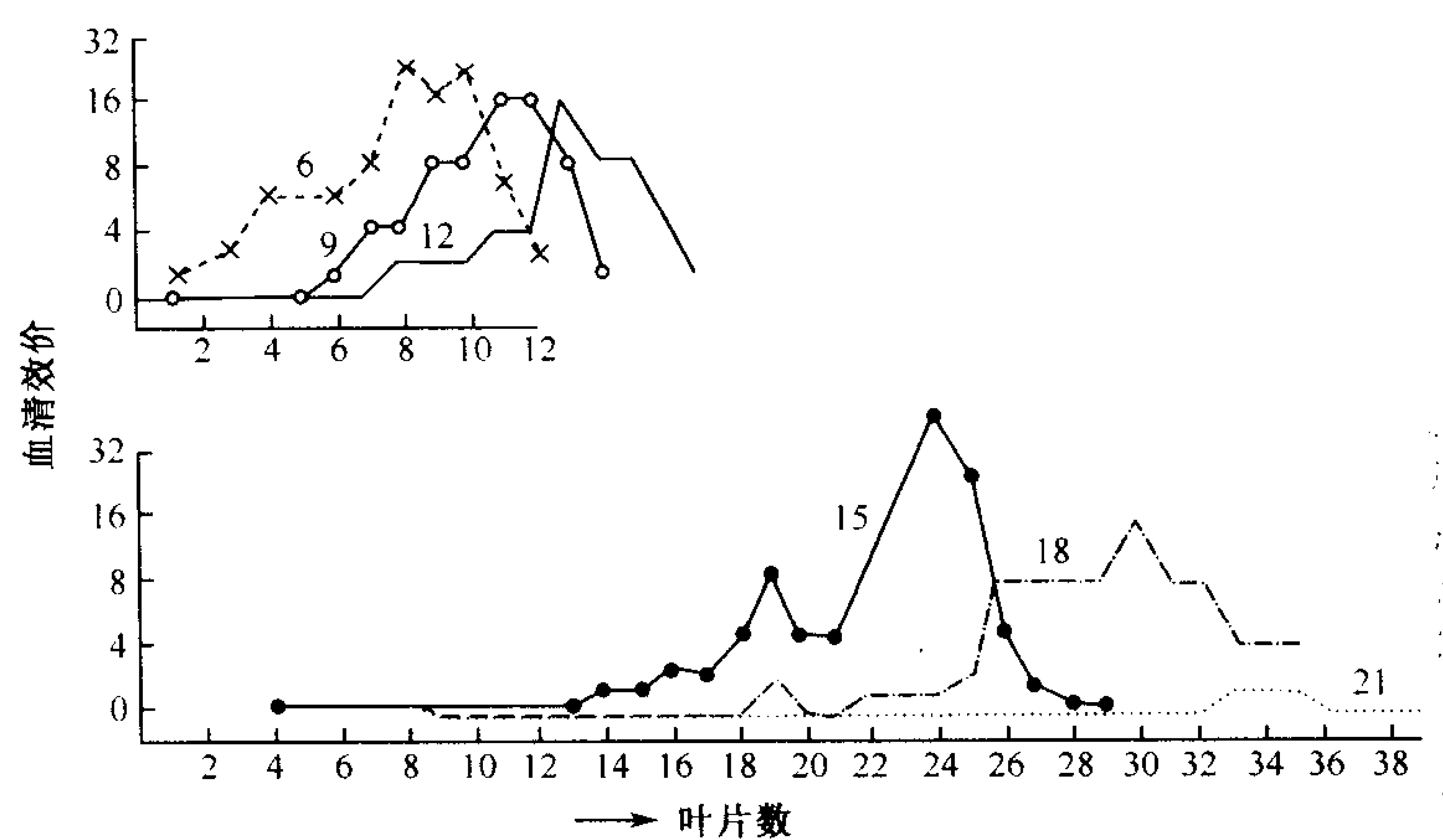


图 4.1 在单株三生烟（*Samsun tobacco*）的第 1 叶接种 PVA，不同叶龄的叶片中病毒浓度的变化。病毒浓度通过血清学方法进行测定。从第 15 周以后，老叶已经死亡。曲线旁边的数字代表接种后的周数。承蒙版权所有者（Blackwell Science Ltd.）惠允，引自 Bartels (1954)。

病毒在植物体内的分布有时是不均匀的，这样我们应只选择那些症状明显的植物组织。中脉里的病毒浓度通常要比叶肉组织中低。如果中脉和叶柄比较大，那么应该去掉这些组织。在一些特殊情况下，如果发现某种病毒和肿瘤组织有关，那么就很有必要对这类组织进行分离，如 WTV 和其他一些病毒可引起植物的肿瘤。仅采收感病植株的特定组织还有另外一个原因，就是避开高浓度的抑制物或者对病毒有吸附作用、在随后的分离过程中难以去除的成分。这些成分在新生或幼嫩的组织中浓度很低。在特定的寄主中，只能从这类组织中分离到病毒。同样，与叶片比较，虽然根中的病毒浓度通常较低，但根组织有时是更合适的初始研究材料（Ford，1973）。对某些病毒而言，花可能是合适的材料，而且病毒浓度很高。

值得注意的是，用于繁殖病毒的寄主可能含有另一种病毒或者已被其他病毒侵染。温室中生长的植物被非目标病毒污染的情况并非罕见。TMV、PVX 和 TNV 的一些株系可能非常普遍地存在着，特别是在已开展过一段时间病毒研究工作的温室中。仅靠使用这类易导致污染的病毒的局部斑寄主（如用心叶烟检测 TMV）有时是不够的。因为在第二种（目的）病毒的分离过程中，少量这类顽固的污染病毒可能会被逐渐浓缩。

3. 提取介质（extraction medium）

一旦受侵染的植物细胞发生破裂，细胞内容物便会释放出来并混在一起，病毒粒体处于一种不同的环境之中。因此在分离病毒的各个阶段，通常都有必要使用缓冲液以保持病毒粒体的侵染性、完整性并使其处于非聚集状态。提纯的病毒制剂保持稳定所需的环境可能与粗提液或初步提纯制剂中病毒保持稳定所需的条件不同（Brakke，1963）。而且，不同的因子在一定程度上发生强烈的相互作用，以至于影响病毒的稳定。寻求一种稳定的提取介质需要考虑如下因素：

a. pH 和缓冲体系

大多数病毒在一个相当窄的 pH 范围内是稳定的，因此抽提物必须保持在此范围之内。由于大多数病毒的等电点偏酸，所以将提取缓冲液的 pH 控制在 7～8 便可避免这些病毒发生沉淀。然而，此 pH 范围会破坏某些病毒（如雀麦花叶病毒属）的结构完整性。pH 为 5.0 的缓冲液可使多种正常植物蛋白沉淀，如果病毒不被沉淀下来，那么该缓冲液对病毒的提纯是有利的。常用的病毒提取缓冲液包括硼酸、柠檬酸、磷酸和 Tris（三羟甲基氨基甲烷）。

b. 金属离子和离子强度

有些病毒需要二价金属离子（Ca^{2+} 或 Mg^{2+}）的存在以维持其侵染性，并保持结构的完整。离子强度也很重要，有些病毒在低于 0.2 mol/L 的缓冲液中会裂解，而有些病毒在高于 0.2 mol/L 时不稳定。AMV 粒子在 Mg^{2+} 为 1 mmol/L 的溶液中沉淀，而在高于 0.1 mol/L 时则降解（Hull and Johnson，1968）。对有些病毒来说，Na-EDTA 可将二价粒子引起的聚集降到最低程度。另一方面，Na-EDTA 也可使某些病毒发生降解。

确定 pH、螯合剂和离子强度时应考虑那些稳定病毒粒体的因素（参见第 5 章）。

c. 还原剂和抗酚类化合物的保护物质

提取缓冲液中通常要加入抗坏血酸（ascorbic acid）、盐酸半胱氨酸（cysteine hydrochloride）、2-巯基乙醇（mercaptoethanol）、亚硫酸钠或巯基乙酸钠（sodium thioglycollate）。二硫苏糖醇（dithiothreitol）（Cleland 试剂）是一种很有用的还原剂，因为它不易被空气氧化。这类物质与植物提取液的氧化产物结合有助于那些易于丧失侵染性的病毒保持稳定，同时还可减少寄主组分对病毒的吸附。酚类物质尤其会增加病毒分离及保持稳定的难度。在分离过程中，下面一些方法在不同程度上将酚类物质对植物病毒的影响降到最低：

（1）向提取缓冲液中加入半胱氨酸或亚硫酸钠可抑制酚氧化酶，而且还可与苯醌（quinone）结合（Pierpoint，1966）。

（2）多酚氧化酶含有铜。两种铜离子螯合剂——二乙基二硫氨基甲酸酯（diethyldithiocarbamate）和乙基黄原酸钾（potassium ethyl xanthate）曾用于制备某些病毒的侵染性制剂（如 PNRSV，Barnett and Fulton，1971）；前者还是一种还原剂。

（3）有时与病毒竞争酚类的物质也用于病毒的分离。例如，Brunt 和 Kenten（1963）使用各种可溶性蛋白质和兽皮粉（hide powder）从可可叶片中获得了有侵染性的 CSSV 制剂。含有酰胺键（amide link）的合成聚合物可结合丹宁（tannin）并与之形成复合物，其中最重要的是聚乙烯吡咯烷酮（polyvinyl pyrrolidone，PVP）。

d. 去除植物蛋白和核糖体的添加剂

许多病毒在体外会迅速丧失侵染力。原因之一就是提取液或者初步提纯制剂中存在着核糖核酸酶。Dunn 和 Hitchborn（1965）在分离多种病毒时使用镁皂土（bentonite）作为添加剂，并对其进行了详细研究。他们发现，在适当的条件下，病毒终产物中核糖核酸酶的污染可被降低或消除。另外，Mg^{2+} 浓度为 10^{-3} mol/L 或者稍高时，核糖体、19S 蛋白和破碎的叶绿体中的绿色微粒很容易被皂土吸附。然而，不同批次皂土的活性可能存在差异，而且皂土可能使某些病毒发生降解，因此要小心使用。木炭（charcoal）也可用于吸附和去除寄主物质，尤其是色素。木炭可通过随后的过滤而去除，但是也可

能导致吸附于滤饼（filter cake）中的病毒大量丢失。

在 pH 7.4 的缓冲液中，0.01 mol/L 的 Na-EDTA 可导致大多数核糖体发生降解，从而避免它们与病毒共沉淀。Na-EDTA 仅可用于那些不需要二价金属粒子保持其稳定性的病毒。

e. 酶

通常会根据不同的用途向初始提取物中加入各种酶类。Adomako 等（1983）发现，沉淀病毒之前使用果胶酶（pectinase）可降解叶片提取物中的黏质（mucilage）。对于那些仅存在于韧皮部组织中的病毒而言，利用崩溃酶（driselase）和其他酶类与纤维残质一起温育可提高病毒的产量（Singh *et al.*，1984）。这类含有果胶酶和纤维素酶的物质有助于纤维碎片中残存病毒的释放。这类酶还能降解与病毒共沉淀的物质。Jones 等（1991）发现，水稻组织经 Celluclast 消化后可提高两种水稻东格鲁病毒的产量，效果优于崩溃酶。以最适浓度的胰蛋白酶（trypsin）处理可显著提高 TuMV 的纯度（Thompson *et al.*，1988）。

f. 去污剂和其他添加剂

初始提取液中通常要加入 Triton X-100 或 Tween-80 这类非离子型去污剂，有助于从不溶于水的细胞组分中释放病毒，还可将污染或禁锢病毒粒体的细胞膜（cellular membrane）降解。然而，去污剂不能用于带有包膜的病毒。

有些病毒粒体存在于内含体之中，如花椰菜花叶病毒。Hull 等（1976）证实用尿素（urea）或 Triton X-100 处理后可破坏内含体。

4. 提取程序

提取之前将植物组织用液氮冷冻处理能够使维管组织破裂，从而使局限于韧皮部中的病毒释放出来，而且有助于随后寄主组分的去除。然而对于某些病毒而言，冷冻处理反而会起到相反的效果。

将感染病毒的组织粉碎或匀浆的程序很多，其中包括：① 研棒和研钵，适合少量样品的处理；②各种规格的食品匀浆器和果汁压榨器，适用于处理中等规模的样品；③ 滚轧机、胶体磨（colloid mill）和商用肉类粉碎机可处理几千克组织。对于长的、易碎的杆状病毒而言，最安全、对病毒损害最低的措施就是使用研钵和研棒粉碎植物组织。匀浆器会使 BYV 粒子断裂（Bar-Joseph and Hull，1974）。加入酸处理的沙子可大大提高提取效率。如果使用提取缓冲液，通常有必要保证破裂的细胞立刻与提取液接触。一般用纱布（muslin）或粗平布（cheesecloth）对粉碎的植物组织进行过滤。

5. 病毒的预分离

a. 提取液的澄清

在粗提液中，病毒和相同粒度范围的细胞组分混合，而且这些细胞组分在某些方面的特性相似。这些粒子包括核糖体、叶绿体中容易聚集的核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶（rubisco）大亚基蛋白、植物铁蛋白（phytoferritin）、膜碎片和断裂的叶绿体碎片。此外还包括破裂的细胞、细胞壁碎片、细胞中所有小的可溶性蛋白质和低分子质量溶质。

病毒分离的第一步通常是设法尽可能多地除去大分子质量的寄主成分，并将病毒保

留在溶液中。提取介质可沉淀核糖体或将其降解。有时需要将提取物进行一些处理如50～60℃加热数分钟、冻融、酸化使 pH 低于 5 或者加 K_2HPO_4 以凝结更多的寄主物质。这些处理可能使病毒受到破坏，因而处理方法的选择要因病毒种类而定。对某些病毒而言，有机溶剂如氯仿可非常有效地沉淀寄主成分。对于其他病毒，用正丁醇-氯仿和提取物振荡可以使大多数植物组分变性。被处理的提取物随后经过低速离心（如5000～10 000*g*，10～20 min）将细胞碎片和被凝结的寄主成分沉淀下来。利用丁醇-氯仿体系离心分相后，病毒存在于水相，而变性的蛋白质存在于两相的界面处。需要明确的是：虽然有些病毒能够耐受丁醇-氯仿的处理，但其他病毒经此处理后损失则很严重。与丁醇-氯仿混合物比较，氯仿单独处理的效果比较温和。溶剂和去污剂显然不能用于带有包膜的病毒。应该牢记，在使用大体积的有机溶剂时应该考虑安全事项。

对多种病毒来说，最后在 4℃下进行分离，而且操作要尽可能地迅速。另一方面，有些病毒附着于膜上或细胞内的其他结构，所以在获得叶片粗提物之后将病毒从这些结构上释放下来可能需要一些时间。提取后不久进行低速离心可导致大量病毒丢失于第一步沉淀中，但另一方面，此方法也可用于浓缩病毒。

b. 病毒的浓缩和低分子质量物质的去除

i. 高速离心

足够时间的高速离心可使病毒沉降下来。倘若沉降过程未引起特定病毒变性，那么该病毒还会在溶液中以一种活性形式存在。这是一个非常有用的步骤，可达到浓缩病毒和去除低分子质量物质这两个目的。然而，高速离心是一种强烈的物理过程，有些病毒粒体可能被破坏（如有些呼肠病毒科病毒，Long *et al*.，1976）。有些病毒在高速沉降之后，沉淀被重新悬浮时仍持明显的聚集状态，而且这些聚集体中的病毒粒体彼此间附着得相当牢固（Tremaine *et al*.，1976）。如果寄主的膜类物质结合了病毒粒体，使用非离子型去污剂有助于病毒粒体的释放。如果病毒以非常低的浓度沉淀，回收率也会很低。随着转头停止转动，小块的病毒沉淀发生溶解和重新分布可能是导致病毒丢失的主要原因（McNaughton and Matthews，1971）。沉淀物表面粒子的重新悬浮可导致沉降较慢组分的大量损失（Matthews，1981）。

ii. 聚乙二醇沉淀

Hebert（1963）发现，一些植物病毒可在单相聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）体系中优先沉淀，即使有些寄主 DNA 也可被沉淀下来。PEG 沉淀法从此成为最广泛使用的病毒分离程序之一。沉淀的具体条件决定于 pH、离子强度和大分子的浓度。虽然对该方法进行了一些尝试并总结出相关的理论，但其在特定病毒分离上的应用依旧是根据经验进行的（Juckes，1971）。

PEG 沉淀法可用于多种病毒，甚至是易断裂的病毒。例如，已有一个可获得较高产量的完整 CTV（一种易断裂的杆状病毒）粒子的操作程序（R. F. Lee *et al*.，1987）。虽然在提纯过程的第二步中经常用到（低速-高速）差速离心，但是 PEG 法无需昂贵的超速离心机，这也是该方法的优点所在。

iii. 密度梯度离心

许多病毒，尤其是杆状病毒，易于形成难以重新悬浮的沉淀。密度梯度离心无需沉淀即可对这类病毒进行浓缩。密度梯度如图 4.2 所示。密度梯度经过改进之后，有时甚

至可使用角转头完成病毒的初始浓缩，而无需在离心管底部形成沉淀。将几毫升高密度蔗糖置于离心管底部形成蔗糖垫，上面覆盖 2 cm 高的低密度蔗糖柱，离心管的其余部分用澄清后的病毒提取液充满。在合适的条件下，可在两个蔗糖层的界面处收集病毒。一个类似的应用方法是在离心前将中等密度的蔗糖垫置于离心管底部，这样可避免叶绿素污染病毒沉淀。密度梯度离心已用于多种病毒的分离。

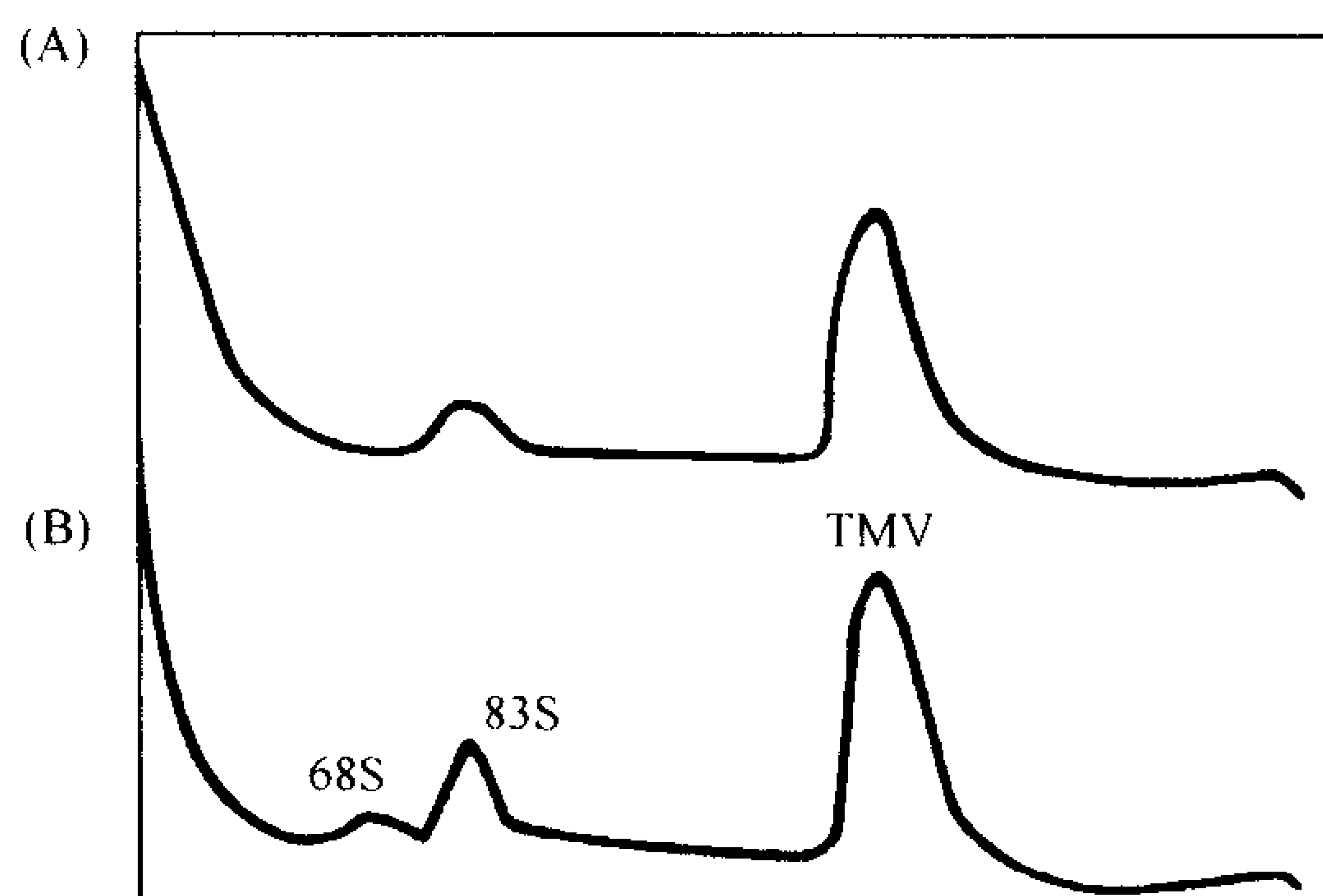


图 4.2 用于测定粗提液中病毒的密度梯度离心法。从接种 TMV 的烟草叶片的表皮（A）或皮下组织（B）提取 30 mg 病毒粗提物，在 10%～40%的蔗糖梯度中经过 35 000 r/min、2 h 离心后可使病毒沉降下来。通过自动扫描装置测定病毒在 254 nm 处的吸光率（absorbance）。注：在来自表皮的粗提物中检测不到 68S 核糖体。

iv. 盐沉淀或结晶

在高速离心广泛应用之前，一般通过盐析沉淀分离植物病毒。对于在高盐溶液中不失活的病毒，盐析沉淀依然是一种有用的方法。虽然有多种其他盐类可将病毒沉淀或结晶，但最常用的是约 1/3 饱和度的硫酸铵。加入硫酸铵放置几小时或数天后便可通过低速离心获得病毒沉淀，然后用小体积的适当的介质将病毒重新悬浮。

v. 等电点沉淀

大多数蛋白质在（或接近）等电点时的溶解度都很低。等电点沉淀可用于在相关条件下比较稳定的病毒。病毒沉淀经离心或过滤收集后用适当的介质溶解。

vi. 透析法

通过纤维素膜透析可将初始提取物中低分子质量的物质去除，也可用于更换介质。盐沉淀或结晶后常通过透析去盐，或者在密度梯度分部后通过透析除去盐溶液或蔗糖溶液中的盐，这部分内容将在下一部分讨论。

6. 病毒制剂的进一步纯化

病毒制剂经过一个纯化和浓缩步骤之后，可能还含有某些低分子质量或高分子质量的寄主组分。这些物质可通过进一步的纯化步骤去除。使用的程序很大程度上取决于病毒的稳定性，制剂的规模大小和用途。

有时可重复应用同一程序获得高纯度的病毒制剂。例如，可使用硫酸铵对一种制剂进行反复结晶或沉淀，或者进行几个循环的高速和低速沉降。后一程序可优先去除寄主大分子，因为在高速沉降后的沉淀被重悬时，生物大分子仍保持不溶状态。在这一程序

中病毒经常出现丢失，因为病毒沉淀只有部分溶解或全部未溶解，或者因为病毒重悬的时间不够充分。对于杆状病毒这一点尤其困难。移去上清液之前病毒的重悬也可导致病毒的损失。对于非常小的沉淀而言，表面积/体积系数高时病毒的损失会更加严重。

在分离过程中，通常依据病毒的不同特性使用至少两种提纯程序对病毒的分离是很有益的。与重复使用同一程序相比，这种方案去除寄主成分的效果更好。

a. 密度梯度离心

对于进一步纯化和测定而言，Brakke（1951；1960）建立的密度梯度离心技术是一项非常有用的方法，特别是对那些稳定性差的病毒更是如此。现已证明：密度梯度离心技术非常通用，而且广泛应用于病毒学和分子生物学领域。在病毒研究中，该技术在很大程度上取代了分析超速离心技术。离心管中部分地注入了自底部到顶部浓度逐渐降低的溶液。对植物病毒的纯化来说，蔗糖是常用的梯度物质，离心前将病毒溶液加于梯度的上部。在铯（cesium）盐形成的梯度中，沉降开始时病毒粒体可以遍布于溶液当中，或者位于密度梯度之上。

Brakke（1960）详述了密度梯度使用的三种方式。离心时间延续到梯度中的所有颗粒都到达与其密度相等的介质的区域，即等密度梯度离心（isopycnic gradient centrifugation）。这种类型的离心是基于不同的密度将不同的粒体分开。对多种病毒而言，只用蔗糖难以提供足够的密度以支持病毒等密度区带的形成。在速率区带沉降（rate zonal sedimentation）方法中，在离心之前，将病毒加于一个预先形成的梯度之上。每种颗粒的沉降速度取决于其大小、形状和密度，进而在整个梯度中形成不同的区带。当粒子仍在沉降时即停止离心。平衡区带沉降（equilibrium zonal sedimentation）类似速度区带沉降，只是沉降过程要持续至大多数粒子到达接近等密度的位置。密度梯度在这些技术中的作用是防止对流搅动，并使不同种类的分子聚集在限定的区带中。密度梯度离心的理论很复杂。在实践中，这项技术是一种广泛应用于植物病毒学研究、简单且有效的方法。

密度梯度离心需要一台高速的制备型超速离心机以及合适的甩平式转头或角转头。因为光散射作用，离心后可观察到病毒带。测定前可通过适当的方式取出离心管中的内容物。操作时可将离心管底部刺穿，使内容物滴入一组试管中。可用一种浓蔗糖溶液对离心管中内容物进行向上置换，基于此原理的分部分离装置已经商品化。液柱的紫外吸收可被监测和记录，并可对各种体积的分部根据要求进行收集。图 4.2 显示了此程序的灵敏度。

由于可对梯度中的连续分部进行收集，因此可以利用多种手段对病毒、无侵染性的类似病毒的组分和寄主物质加以鉴定。这些技术包括侵染性测定、紫外吸收光谱和电子显微镜检查。如果选用的程序合适，非常小的沉降速度差别都可以检测出来（Matthews and Witz，1985）。

在速率区带沉降中，如果混合物中某些组分的沉降系数是已知的，那么也可估算出其他组分的大概数值。如果有可用的抗血清，那么便可对不同的分部进行血清学检测，或者在使用梯度前将抗血清和样品混合。那些与抗血清反应的组分将会从沉降带型中消失。

上述类型的密度梯度离心可以给出病毒制剂纯度的某些信息。这些技术还可建立起粒子和侵染性之间的相关性，并揭示出非侵染性的类似病毒粒体或多分体病毒的存在。

单组分的区带在梯度物质中扩散的范围比光密度痕迹检测到的更广。如果要求组分不发生相互混合污染，那么进行数轮密度梯度离心就很有必要。多组分病毒的有关研究工作显示：若使一种组分中绝对不含有其他的组分是极其困难的，即使进行几次密度梯度分离后仍是如此。使用非离子型介质 Nycodenz 制备的梯度对某些病毒的进一步纯化很有效（Gugerli，1984）。

Brakke 和 Dayly（1965）发现，不理想的沉降引起的主要组分的区带扩散可导致与其重叠的次要组分的区带发生扩散。从梯度中移出区带的方式对交叉污染的程度具有显著影响。

对于非常稳定的病毒来讲，像氯化铯（CsCl）这类强盐的溶液也是有效的梯度介质。在两种不同梯度中连续分部分离有时可获得有用的结果。在强 CsCl 溶液中，病毒的有效浮力密度和稳定性主要取决于 pH 和溶液中存在的其他离子（Matthews，1974）。在 CsCl 中不稳定的病毒可能在 Cs_2SO_4 中表现稳定（Hull，1976）。

当一种病毒制剂在 CsCl 或 Cs_2SO_4 中进行密度梯度离心时，可能会形成多个条带。这可能是因为制剂中存在 RNA 含量不同的多个组分，在 TYMV 中已发现这种现象（Keeling *et al.*，1979）。由于离子结合力的不同等因素，含有均一量核酸的病毒粒体在 CsCl 或其他盐类梯度中有时也会形成多个条带（Hull，1977；Noort *et al.*，1982）。

b. 凝胶过滤

有些病毒在高速离心沉淀时不稳定，那么可使用琼脂胶或者葡聚糖凝胶（Sephadex）对其进一步纯化。但是这一程序会将病毒稀释。

c. 免疫亲和柱

单克隆病毒抗体可被交联到琼脂糖等支撑物上形成吸附柱，流经吸附柱的液体中所含有的病毒可被特异性地吸附在柱上。随后可通过降低 pH 将病毒洗脱下来。澄清的植物汁液可能破坏吸附柱的活性（Ronald *et al.*，1986），而低 pH 可能对病毒造成损害。为了避免使用这种处理，De Bortoli 和 Roggero（1985）建立了一种电泳洗脱技术。这种柱子可能仅在某些特殊情况下使用。

d. 层析法

层析技术有时也可作为一种纯化初步提纯制剂的有效程序。McLean 和 Francki（1967）利用磷酸钙凝胶柱在磷酸缓冲液中纯化了 LNYV。Banttari 和 Zeyen 利用纤维素柱层析纯化了 OBDV（1969），而 Smith（1987）利用快速蛋白液相层析技术分离了 CPMV 的两个电泳型。

e. 病毒浓缩和低分子质量物质的去除

在分离病毒的各个阶段，有必要进行病毒浓缩并去除盐或糖类。对于可稳定沉淀的病毒，通常是通过高速离心来浓缩病毒并由此减少低分子质量物质的含量。盐类的去除或交换则通过常规的透析进行。对于那些不稳定的病毒，可选择其他的实验程序。可在病毒制剂中加入干燥的凝胶粉（如葡聚糖），或者将透析袋中的制剂置于干燥的凝胶粉中并在冰箱中放置数小时，水和离子在通过葡聚糖孔时被吸附掉。通过膜的压力进行超滤（ultrafiltration）可浓缩大体积的样品并去除盐类。将盛有病毒溶液的透析袋悬挂于通风气流中发生的全蒸发（pervaporation）可能因管壁的局部干燥以及一些盐类的浓缩

而导致病毒的损失。

7. 提纯病毒的保存

对多种植物病毒而言，需要解决的问题是如何将提纯制剂保存数天或更长的时间。最好的方法当然是在提纯结束后尽快使用以避免长时间存放。在最适条件下，除 TMV 以外的大多数病毒在 4℃长期保存都会丧失侵染力，无论是在溶液中还是处于结晶状态（在硫酸铵中）均是如此。这种保存条件会导致细菌或真菌的生长，使外来的抗原和酶类污染病毒制剂。加入低浓度的叠氮钠（azide）、麝香草酚（thymol）或 EDTA 可防止微生物生长，但是 EDTA 会影响病毒的结构。可在病毒制剂中加入等体积的甘油使之以液体状态在低温下保存。另外，也可小心地在介质中加入添加剂（合适的缓冲液加上某些保护性蛋白、糖或多糖），这样病毒便可在超低温溶液中或者以冻干粉状态在相当长时间内保持侵染力（Fukumoto and Tochihara，1984）。用于核酸和蛋白质分析研究的病毒制剂在各组分被分离之后，最好以冷冻液状态保存。

缓冲液中病毒浓度（如 TYMV）超过 10 mg/ml 时，病毒粒体会发生相当强烈的相互作用并自然降解，尤其在离子强度低时更为明显。

8. 侵染性粒体的鉴定和纯度标准

确定病毒制剂纯度的最好方法取决于实验目的以及所要得出的结论。制备病毒制剂主要有如下三个目的：① 确定一种新分离病毒的一般特性，这方面将在下面章节讨论；②用于特定病害的辅助诊断，在第 14 章将对此进行讨论；③制备特异性抗血清或者诊断用核酸探针。

a. 典型病毒粒体的鉴定

对于新分离的病毒，或者在尝试分离这类病毒的过程中，主要目标就是充分地提纯病毒以鉴定侵染性的粒子并至少初步确定其特征。最合适的方法就是将提纯制剂进行蔗糖密度梯度离心。梯度中分离出的成分可单独进行侵染性试验，如果存在多分体病毒，可通过多个不同的组合进行试验。病毒的紫外吸收光谱可以通过测定获得。样品可通过电镜检查以确认是否存在典型的病毒粒体。蔗糖梯度系统的其他优点在于所需病毒的量相当小，而且可获得病毒沉降系数的估计值。

b. 纯度标准

关于病毒制剂纯度的讨论有很多。但是从本质上讲，一种制剂的纯度应该达到其最终用途所需的要求。因此，如果病毒制剂用于抗血清的制备，那么它不应含有正常的寄主蛋白；如果用于制备病毒特异的杂交探针，则制剂中不应含有寄主的核酸。至于后一点，如果通过克隆操作制备探针，那么应该承认克隆本身就是一种纯化方法。

应用于病毒制剂的许多纯度标准涉及多种测定方法的使用，将在第 15 章中讨论。结晶化在过去被认为是一项重要的纯度标准，但是它不能将与侵染性病毒共结晶的组分区分开。一种核蛋白型光谱经常被提出作为纯度的证据。这是一项极差的测定标准，因为制剂中可能含有不易检测到的大量寄主核蛋白或多糖，或者相当多的寄主蛋白。倘若污染物未与病毒一起沉淀且浓度足够大，那么可通过密度梯度分析或者沉降来发现非病毒物质的存在。

对某些球形病毒的提纯制剂进行沉降分析可发现二聚体或三聚体的存在（Markham，1962）。当然这些有可能和寄主的污染物混淆，除非进行其他测试。同样，杆状病毒制剂含有比病毒粒体短的、不同长度的粒子。这些短的粒子和病毒聚集，在沉降时形成很宽的区带，也可能出现两个或多个离散的峰。沉降分析对于判断多分体病毒中是否存在非病毒物质帮助不大，这是因为病毒粒体占据了沉降分布型中的更多细节。

对于在强盐溶液中稳定的病毒或病毒组分而言，CsCl 或 Cs_2SO_4 平衡密度梯度离心是比沉降速率分析更加灵敏的同质性分析标准。例如，自 TYMV 制剂中分离的 B_0 非侵染性核蛋白的提纯制剂通过沉降速率分析仅显示单一组分，但是经过 CsCl 平衡沉降之后可明显看出这是由一种以上的组分构成的混合物（Matthews，1981）。

倘若外源物质足够大而且外观上不同于病毒，那么电镜是定性地判定是否存在这类物质的常用技术。提纯制剂中的核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶、植物铁蛋白或者植物膜结构碎片都可通过电镜观察到。小的蛋白质和低分子质量物质难以用电镜看到，除非它们在网格上形成结晶或者以相当大的量存在。

免疫扩散和免疫电泳等血清学试验提供了检测具有抗原性的、可扩散性的寄主杂质的非常灵敏的方法，这一点和核酸杂交试验可以检测核酸的污染相似。

像 TMV 这类特殊的病毒，其全部组分已经非常明确。通过对主要成分进行化学分析，如磷氮比，可以发现含有氮或磷的杂质，只要这些杂质的量足够大。有些情况下，可以利用更为复杂的化学方法如蛋白质末端氨基酸分析法，这种方法可以精确到一个氨基酸。对于特征非常明确的病毒蛋白质，可以对经胰蛋白酶消化后产生的肽进行指纹分析，但是作为纯度分析来讲，这项技术的灵敏度不是很高。

放射化学方法可以多种方式用于纯度检验。如一株健康植物可被 ^{32}P 正磷酸盐或 ^{35}S 硫酸盐标记数天。在对叶片进行提取之前，把已标记的材料与等量的、未标记的感染病毒的组织混合。如果所用的放射能的量达到毫居里（millicurie，10^7 Bq），那么该方法的灵敏度会降低。虽然如此，对含有这两种元素的化合物来说，这不是完整的纯度检测。例如，病毒的侵染可能产生一种在健康组织中不存在的污染物。目前，确定应该使用何种纯度标准的唯一准则是，它们应该保证病毒制剂能够完全满足实验目的所需。

9. 植物中病毒的浓度和提纯病毒的产量

a. 产量的测定

对植物中病毒浓度的估计还存在很多难点和不明之处。

i. 未抽提的病毒

除了病毒以相当大的比例结合在细胞碎片上或者保留在小泡或细胞器中之外，从植物组织中提取病毒所用的方法通常也存在着未知因素。有些病毒，尤其是在细胞中存在于大型纤维状内含体中的杆状病毒，在分离的初始阶段会保持聚集状态。在病毒纯化过程中的损失可能相当严重且程度不一，而且导致病毒损失的各种因素的影响程度尚未得到充分评估。

ii. 测定方法

测定病毒产量的方法取决于病毒提纯的用途。如果是用于血清学研究，衡量标准就是病毒粒体的量，而不管它们是否具有侵染性。如果提纯的病毒是用于侵染性研究，或

者用于制备基因组的全长克隆，核酸的完整性就极为重要。侵染性测定不能得出病毒数量的绝对估计值，而且会受多个变量的影响。对一种相当稳定的病毒来说，可通过在初始材料中加入一种少且定量的、放射性标记的病毒来获得这类损失的估计值。根据最终制剂中回收到的标记病毒的比例便可获得病毒损失的估计值。然而，这个方法不能用于结合于细胞结构内部的病毒研究。

对于那些以足够高浓度发生的病毒而言，通过对澄清提取液进行蔗糖密度梯度分析可能是获得植物提取物中病毒浓度估计值的最为直接的方法。另外，也可通过制剂的紫外光谱（需注意杂质的影响）、免疫点印迹或杂交点印迹获得病毒浓度的估计值。

iii. 组织取样

如第 9 章第Ⅱ节 J 部分所述，植物的不同部分的病毒浓度变化很大，甚至在一个表现花叶的叶片上不同部位的病毒浓度也存在差异。

iv. 结果表述的基础

病毒浓度或病毒产量通常表述为每单位组织鲜重或每毫升提取物中的病毒量。然而，即便是同一植株中的不同组织和不同叶片，由于液泡的大小或纤维物质量的差异，在相同条件下的含水量差异都很大。

b. 报道的病毒产量

对于上述问题，目前还没有完全令人满意的答案。大多数科研人员在报道一种病毒的分离结果时，如果他们给出了病毒产量的估计值，会将其表述为：从特定重量的起始材料中获得的提纯病毒的重量。这些材料通常是整个或者去除中脉的叶片。因为寄主品种、生长条件和分离程序等因素存在差异，不同实验室对相同病毒的报告产量变化也很大。病毒的产量变化很大，如每克组织鲜重中可获得数毫克的 TMV 和 TYMV，而水稻东格鲁病毒则低至 1～2 μg/g（Jones *et al.*，1991），黄症病毒属病毒（luteoviruses）的产量更低，低于 1 μg/g（Matsubara *et al.*，1985）。

10. 讨论和总结

从受侵染的组织中提取病毒的产量差别极大，不同病毒之间变化范围可达 10 000 倍（从 0.4 μg/g 鲜重或更少到 4000 μg/g 鲜重）。在分离和保存过程中，不同的病毒对接触到的理化因子和酶类所表现的稳定性也存在显著差异。因此，必须对每一种病毒，甚至同一病毒的不同株系的提纯程序加以优化。

关系到病毒成功分离的重要因子有：①寄主品种和繁殖条件的选择应使病毒最大限度地复制，并将干扰物质的形成减至最少；②提取介质不应使病毒受到钝化或者发生不可逆聚集。

大多数病毒的分离提纯可结合使用两种或更多的实验程序，其中包括高速沉降、密度梯度离心、聚乙二醇沉淀、盐沉淀或结晶、凝胶过滤和透析。将提纯制剂进行密度梯度分离，并利用物理学和生物学方法检测组分中的粒子，通常可获得具有侵染性的病毒粒体。

分离一种新的病毒或株系时，有必要将分离的病毒回接原始寄主，由此确认其是否为初始病害的病原。但是必须注意提纯病毒的保存条件，因为许多病毒在分离后可能会很快丧失侵染能力或发生其他变化。

正如前面所述，从化学角度讲，不存在绝对纯的病毒制剂。纯度和同质性只是操作

上的术语。如果杂质或非均一性对实验目的没有影响，可认为该病毒制剂对于此特定实验目的而言是纯的。

第Ⅲ节　组分

多数植物病毒的基因组包装在由许多小的蛋白质分子组成的圆柱形或等轴形外壳之内。病毒基因组大多是 RNA（表 4.1），其中多数为信使 RNA 或正义 RNA。在这些小的几何体病毒之中通常只含有一种蛋白质分子，但有些病毒则含有两种蛋白质分子。有些病毒为负义 RNA 或双链 RNA 基因组，而有些为正单链 DNA 或双链 DNA 基因组。一些植物病毒覆被着由脂蛋白构成的外包膜。有些较大的病毒还包含几种病毒编码的蛋白质，其中包括参与核酸合成的酶类。因此，所有病毒的主要成分为蛋白质和核酸。有些含有脂类，而有些还包括小的分子如多胺（polyamine）和金属离子。本节将对这类组分的分离和某些特性进行讨论。

表 4.1　侵染不同界寄主的病毒基因组

基因组核酸	植物		真菌		动物		细菌	
	数量	%	数量	%	数量	%	数量	%
dsDNA	0	0	1	3.5	606	26.5	445	75.4
ssDNA	166	17.0	0	0	58	2.5	88	14.9
RT	31	3.2	0	0	112	4.9	0	0
dsRNA	45	4.6	27	93.0	383	16.7	1	0.2
(－) ssRNA	100	10.2	0	0	604	26.5	0	0
(＋) ssRNA	635	65.0	1	3.5	525	22.9	57	9.6
总计	977		29		2288		591	

注：ds，双链；ss，单链；RT，以反转录方式进行复制的病毒（其基因组可能为 DNA 或者 RNA）。

每个病毒属中至少有一个成员已完成或即将完成基因组序列测定。从研究病毒的进化、分类和病毒基因及其调控元件的角度讲，研究人员的兴趣更加趋于比较不同病毒的核苷酸及其氨基酸序列。Reeck 等（1987）注意到：在比较两个实际上为具有“相似性”（similarity）的序列的过程中，文献中不准确地使用了“同源性”（homology），从而引起术语上的混乱。相似性是一种事实，是一种从统计学意义上对两个序列进行量化的特性。同源性描述的是两个事物之间的关系，在生物学上具有精确的含义，即“拥有一个共同的进化起源”。因此，一个序列是同源的或者不是同源的。同源的序列在进化意义上可以是高度相似的，也可能不具有显著的序列相似性。考虑到准确使用术语的重要性，本书作者将力图保持这种区别。

A. 核酸

对许多含有 ssRNA 的病毒而言，其基因组 RNA 可以直接作为 mRNA 侵染寄主。这类分子被称为正义 RNA 或正链 RNA，互补序列为负义 RNA 或负链 RNA。表 4.1

中列出了植物病毒中发现的核酸类型。

后面的章节将对 ssRNA 给予更多的关注，因为大多数植物病毒含有这种类型的核酸。如同细胞中的 RNA 一样，植物病毒 RNA 也含有腺苷酸、鸟苷酸、胞苷酸和尿苷酸。除了 5′ 帽子结构中的甲基化鸟嘌呤之外（参见第Ⅲ节 A. 3. c），尚未证实植物病毒中存在任何其他的稀有碱基。

与 dsDNA 类似，含有 dsRNA、侵染植物的呼肠病毒科病毒在碱基组成上具有规律性，即鸟嘌呤=胞嘧啶，腺嘌呤=尿嘧啶。对含有 ssRNA 的病毒而言，不存在鸟嘌呤应等量于胞嘧啶或者腺嘌呤应等量于尿嘧啶的情况，许多病毒与碱基配对的规律相差甚远。在含有 DNA 的病毒中，与其他 DNA 类似，即脱氧核糖取代了核糖，胸腺嘧啶取代了尿嘧啶。如果 DNA 为双链，则鸟嘌呤＝胞嘧啶，腺嘌呤＝胸腺嘧啶。Adams 等（1981）对核酸特性做了详细的描述。

1. 分离

核酸分离的总体要求是获得未降解的和未变性的产物，而且尽可能接近于其在病毒粒体中所处的状态。如果，①完整粒子内核酸具有侵染性，②避免极端的 pH，③核酸被保护免受核酸酶的降解，便可选用多种理化因子从病毒中除去蛋白质，从而获得有侵染性的核酸。

有关病毒 RNA 的大多数开创性工作是以 TMV 为材料展开的。这种病毒的 RNA 在蛋白质外壳之中时表现异常稳定。对多数其他的病毒而言，处于完整病毒粒体中的 RNA 可能发生不同程度的降解而丧失侵染性。这种情形可发生于完整植株中，也可发生在病毒的分离和保存过程中。病毒粒体内完整 RNA 的最适保存条件因病毒而异。

苯酚常用于病毒 RNA 的分离。Gierer 和 Schramm（1956）应用一种苯酚法分离出了具有侵染性的 TMV RNA。苯酚是一种有效的蛋白变性剂和核酸酶抑制剂，现在已对这个基本的分离程序做了多方面改进。对一种病毒有效的方法在其他病毒上的效果可能很差。然而，苯酚在某些病毒上的使用效果并不令人满意（如 WSMV，Brakke and van Pelt，1970；BYDV，Brakke and Rochow，1974）。

病毒核酸的有效释放和核酸酶的破坏可用链霉蛋白酶（pronase）和 1% SDS 预温育得以实现。脱氧核糖核酸酶需要 Mg^{2+}，因此可以使用 EDTA 等螯合剂对其进行抑制，然后再用苯酚除去链霉蛋白酶和蛋白质消解产物。当前所使用的多数 RNA 分离方法中，在苯酚抽提过程中经常用到 SDS。对大多数病毒而言，用此方法可获得良好的病毒核酸制剂。如果病毒制剂的浓度足够高，可用 SDS 处理以破坏病毒粒体，如果需要加热和（或）链霉蛋白酶，可在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上直接分离核酸。

多种程序可用于从病毒或受侵染细胞中分离或纯化核酸。这些程序包括蔗糖密度梯度、CsCl 或 Cs_2SO_4 平衡密度梯度离心、羟磷灰石柱分离（Bernardi，1971）、纤维素层析（Jackson *et al.*，1971）以及聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳（Symons，1978）。由于电泳分离快速简便，核酸用量小，可检测到其他方法观察不到的异质性，因此电泳分离是多种实验的首选方法（Fowlks and Young，1970）。

总之，对任何特定的病毒而言，核酸分离方案的设计应考虑获得尽可能多的、符合

要求特质的终产物。这些特质应该包括产量、纯度、结构完整性、侵染性，或者在体外翻译系统中能够保持保真度（Brisco *et al.*，1985）。

2. 确定核酸大小的方法

病毒核酸的大小也许是可通过单一数值体现的一个最重要的特性。除了全序列分析之外，病毒核酸大小的任何一种测定方法都存在某种不确定性。

描述核酸（或蛋白质）分子的大小时，经常出现一些术语上的混淆。分子质量（MW）是分子中所有原子的原子量的总和。分子半径（molecular radius，M_r）指一个（大）分子所占据空间的半径，通常以氢原子半径（M_r）的相对值表述。分子半径一般被认为是描述核酸或蛋白质分子的正确术语。分子质量常用单位是道尔顿（Da）。可用的序列资料在多数情况下避免了这类术语的使用，对于核酸分子更是如此，碱基（b）、千碱基（kb）和千碱基对（kbp）这些单位更具信息性。然而就蛋白质而言，千道尔顿（kDa）目前仍然是广泛使用的单位。

a. 序列分析

许多种病毒的 RNA 和 DNA 以及类病毒的 RNA 序列都已测定，这有助于从化学角度对分子质量进行精确的确定。

b. 凝胶电泳

无论是聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE），还是琼脂糖凝胶电泳都已广泛用于核酸 M_r 的分析，其中要以已知 M_r 的标准“RNA 或 DNA 分子质量标记”的迁移率为参照。因为单链核酸的任何二级结构都会影响分子的迁移率，即 M_r 推定值。即使用甲醛处理也不能消除所有二级结构。如果在 Tris-EDTA 缓冲液（60℃，含有 8 mol/L 尿素，pH 7.5）中进行分析，获得的 M_r 推定值比较可靠（Reijinders *et al.*，1974）。乙二醛（glyoxal）也是一种常用的有效变性剂（Murant *et al.*，1981）。无论使用何种方法和标准物，通过凝胶分析所得到的 M_r 都只是近似值。

c. 复性动力学（renaturation kinetics）

通过对核酸与其互补序列的复性分析，有助于确认一个病毒是否为单分体或者含有两个同样大小、碱基序列不同的 RNA 或 DNA。核酸的序列复杂性可以清晰地揭示出 1 个、2 个或者更多的不同分子的存在（Gould *et al.*，1978）。第 15 章第Ⅴ节 C 部分将对核酸杂交加以详细讨论。

d. 电子显微术

根据单个分子在电子显微照片上的长度测量值，可以估测双链核酸的大小。由于核苷酸间距方面的原因，这种方法对单链核酸来说可能会得出错误的结果（Reijinders *et al.*，1973），而且误差可能相当大，因此需要可靠的标准分子。

e. 物理化学方法

Gierer（1957，1958）通过测定 RNA 的特性黏度和沉降系数估测出所分离到的 TMV RNA 的大小。他发现这种 RNA 的分子质量（m）和沉降系数（s）之间存在着一种普通关系，即 $m = 1100s^{2.2}$。当 s 等于 31 时，分离的完整 TMV RNA 的 MW 为 2.1×10^6。对于 RNA 而言，一些工作者提出了分子质量（m）和 $s_{20,w}$ 之间的经验公式：

$m = ks^d$ (Spirin，1961；Hull *et al.*，1969a)。这类关系是非常有用的，但需要注意，与 PAGE 比较，确定 *s* 值的实验方法需要很大的工作量，而且不是很精确。

3. 单链 RNA 基因组

a. 异质性（heterogeneity）

从提纯病毒制剂中制备 RNA，并根据大小通过某种程序分离 RNA 时，通常会发现存在大小不同的 RNA 分子。在不考虑 RNA 分离和保存过程中发生降解的前提下，出现异质性的原因有如下几个方面：

i. 多分体基因组

在 70 个植物病毒属中，有 28 个属的基因组含有两种或两种以上的大小不同的片段，第 16 章（附录 2）会对此加以讨论。

ii. 异质性的其他来源

(1) RNA 分离之前，病毒内部的 RNA 可能已发生一定程度的降解。

(2) 在受侵染细胞中合成的、小于全长病毒 RNA 的拷贝可能被外壳蛋白包装（Palukaitis，1984）。

(3) 有些寄主的 RNA 意外地被包装于病毒之中。例如，在茄子花叶病毒（EMV）和其他芜菁黄花叶病毒属病毒（tymoviruses）中，发现了一些空的蛋白外壳和含有两三种具有 tRNA 活性的小 RNA 分子（Bouley *et al.*，1976）。这些极有可能是被包装的寄主 RNA。同样，TMV 外壳蛋白中也可能包装有寄主的 RNA（Siegel，1971）。

(4) 许多病毒含有小的卫星 RNA，这些 RNA 在核苷酸序列上与病毒基因组无关（参见第 14 章第Ⅱ节）。

(5) 在一些病毒的侵染中，存在着由病毒序列组成的小的缺损干扰（defective interfering，DI）RNA（参见第 8 章第Ⅸ节 C）。

(6) 如下一部分所述（第Ⅲ节 A. 3. b），溶液中的 ssRNA 可能具有稳定的二级和三级结构。在适当的离子条件下，一种单一的 RNA 分子可能呈现两种或两种以上不同的构型（configuration）。这些构象异构体（conformer）可通过电泳或者离心进行分离。因此，它们可能导致其他的异质性，而且这类异质性并非是由于长度上的差异而形成的（Dickerson and Trim，1978）。

(7) 在特定的条件下，RNA 可能以一种瞬时的二聚体形式迁移（Asselin and Zaitlin，1978）。

b. ssRNA 的一些物理特性

i. 紫外吸收（ultraviolet absorption）

与其他核酸类似，植物病毒 RNA 在 230 nm 和 290 nm 波长之间的紫外区存在吸收光谱（absorption spectrum），很大程度上是由于嘌呤和嘧啶对紫外光的吸收。单个碱基吸收光谱的平均值在接近 260nm 处出现强吸收峰，在接近 235 nm 处吸收值最低。紫外吸收光谱对于区分不同的病毒 RNA 分子通常作用不大。

光径长度为 1 cm 的比色皿中，RNA 溶液在 260 nm 波长的吸收值是一种方便的浓度测定方法。每单位重量的吸收值随着碱基组成和二级结构有所改变。一般来讲，1 mg/ml的 ssRNA 在 0. 1 mol/L NaCl 中 $A_{260}=25$；1 mg/ml 的 TMV RNA，$A_{260}=29$；

TYMV RNA，$A_{260}=23$（在 pH 7 的 0.01 mol/L NaCl 中）（Matthews，1991）。

ii. 二级结构

在完整的病毒粒体中，RNA 的三维排列部分地或完全取决于 RNA 与病毒蛋白的结合方式（参见第 5 章）。在此对已知的病毒 RNA 在溶液中的构象做简要论述。dsDNA 具有非常明确的二级结构，即通过碱基配对和碱基堆积而形成双螺旋。病毒 ssRNA 则没有这种规则的结构。然而，通过一系列的物理方法证实：在室温下接近 pH 7 的 0.1 mol/L NaCl 中，溶液中的 RNA（如 TMV RNA）并非以伸展的线状存在。在适当的条件下，ssRNA 含有许多短小、散布于单链区之中靠链内氢键结合的碱基配对的螺旋区域。在这些条件下，ssRNA 表现为一些程度不同的结构紧密的分子。分子内二级结构的存在程度在某种程度上取决于 RNA 的碱基序列及碱基组成。

通过一系列外界环境的变化可消除 RNA 内部的螺旋区，使分子变为一种随机的、伸展的、无序的卷曲结构（Spirin，1961）。这类条件包括加热、升高或降低 pH，降低浓度或者改变平衡离子（counterion）（如 Na^+、Mg^{2+}）的性质等（Boedtker，1960；Eecen *et al.*，1985）。从螺旋到随机卷曲这一变化使病毒 RNA 的许多可测定的物理特性发生改变。260 nm 吸收值和黏性升高，而沉降速率降低。

缺少二级结构的多聚核苷酸的紫外吸收值约为水解后游离的组成成分核苷酸吸收值的 90%。一个碱基完全配对的分子结构［如一段合成的由 poly（A）和 poly（U）组成的螺旋状多聚核糖核苷酸］，紫外吸收值约为其组成核苷酸的 60%。pH 的变化导致 RNA 分子吸收特性改变的部分原因是分子内碱基配对螺旋区的范围发生变化，以及由于单个碱基的电离状态的改变导致吸收光谱出现迁移。Ehresmann 等（1987）讨论了溶液中 RNA 的结构的探测方法。在适当条件下的溶液中，具有氨基酸接受活性的病毒 RNA 在其 3′端基本都存在着类似 tRNA 的三维构型（参见第Ⅲ节 A. 3. c）。

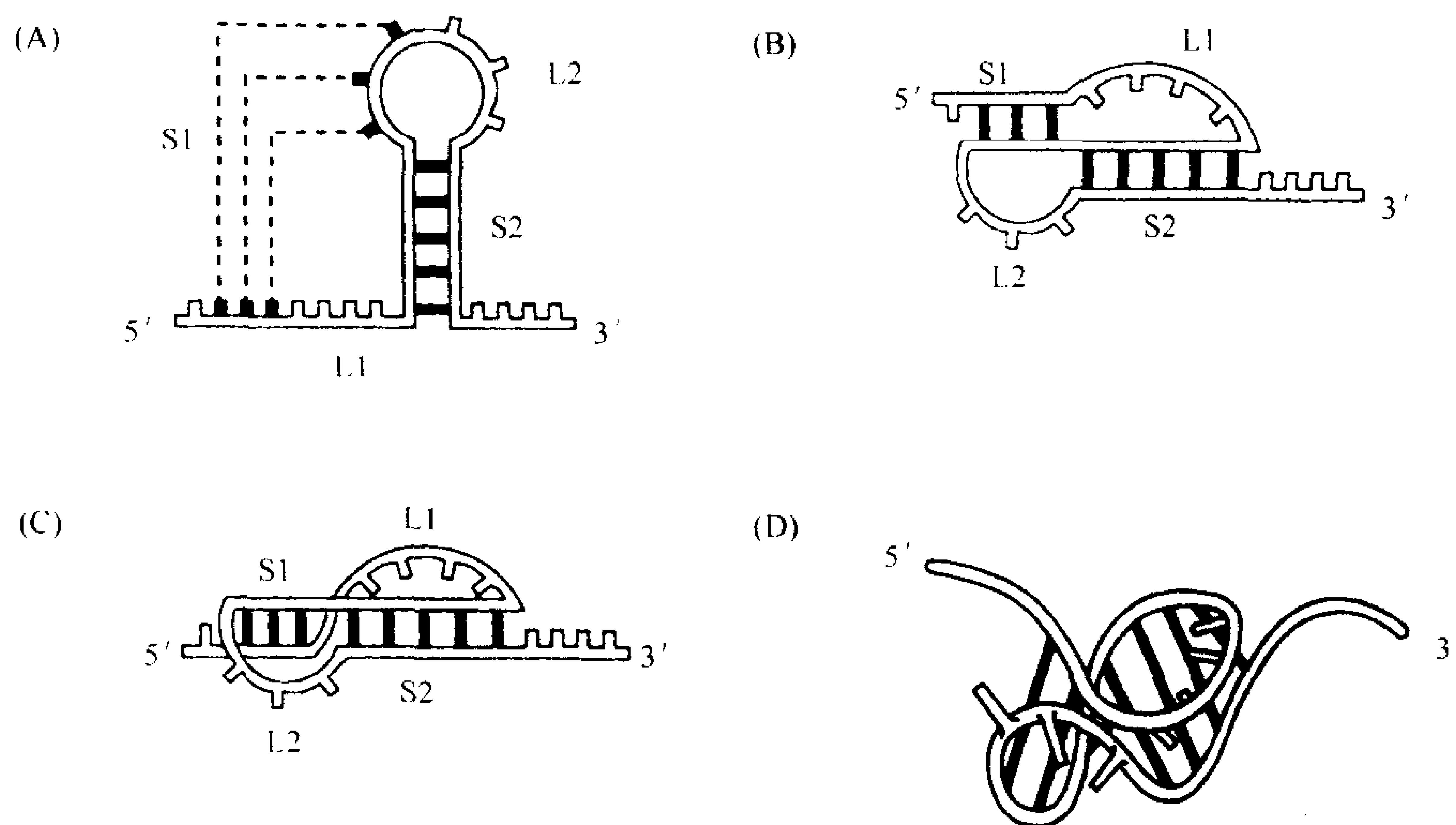


图 4.3 典型的 H（发夹）型 RNA 拟结的结构。（A）二级结构。虚线表示发夹环中的核苷酸与发夹结构 5′端的互补区形成的碱基对。（B）与（C）折叠示意图。（D）三维折叠，图中所示为准连续的双链螺旋。茎部（S1 与 S2）和环部（L1 与 L2）已在图中标明。L1 和 L2 分别横跨一个深沟和浅沟。经允许，引自 Dieman 和 Pleij（1997）。

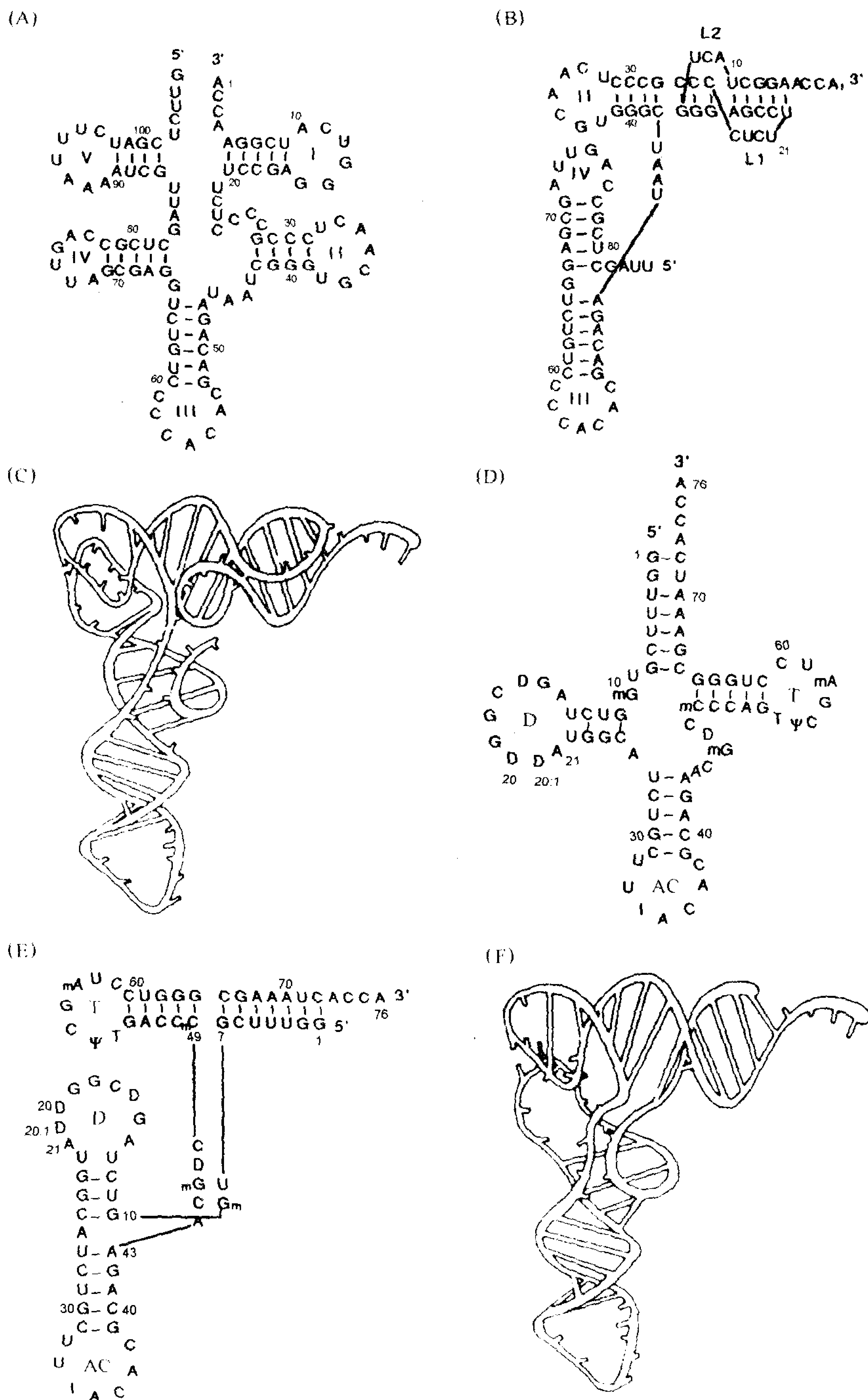


图 4.4 芜菁黄花叶病毒（TYMV）RNA［（A）、（B）、（C）］的类似 tRNA 结构与规范（canonical）tRNA［（D）、（E）、（F）］的比较。（A）TYMV RNA 中 106 个 3′端核苷酸的二级结构，（B）类 tRNA 结构（86 个核苷酸）的折叠方式。（C）类 tRNA 结构（86 个核苷酸）的三维线模型。（D）酵母 $tRNA^{Val}$ 的二级结构。（E）酵母 $tRNA^{Val}$ 的折叠方式［与（B）比较］。（F）规范 tRNA 的三维模型。经允许，引自 Dumas 等（1987）。

iii. 拟结（Deiman and Pleij，1997；Herman and Patal，1999）

RNA 分子可折叠成复杂的三维形态和结构以行使其多种生物学功能。其中最普通的结构是拟结，最简单的形式就是一个茎环结构通过碱基配对与一定距离以外的序列形成的环（图 4.3）。拟结与病毒 RNA 的多种功能有关，其中包括通过 −1 移码（参见第 7 章第Ⅴ节 B. 10）（Giedroc *et al.*，2000）、终止密码子的通读、核糖体内部进入的位点（参见第 7 章第Ⅴ节 . B. 4）和翻译增强子（参见第 7 章第Ⅴ节 C）对翻译进行的调控。

多种植物病毒 RNA 3′端类似 tRNA 的结构也形成拟结（图 4.4 和图 4.5）。这些结构参与对病毒复制的调控（参见第 8 章第Ⅳ节 H. 3）。TYMV 的典型拟结结构已通过核磁共振（NMR）技术得以解析（Kolk *et al.*，1999）。拟结结构具有内部流动性（mobility），这可能是 RNA 拟结调控其与其他 RNA 分子或蛋白质相互作用的一种普通特征。

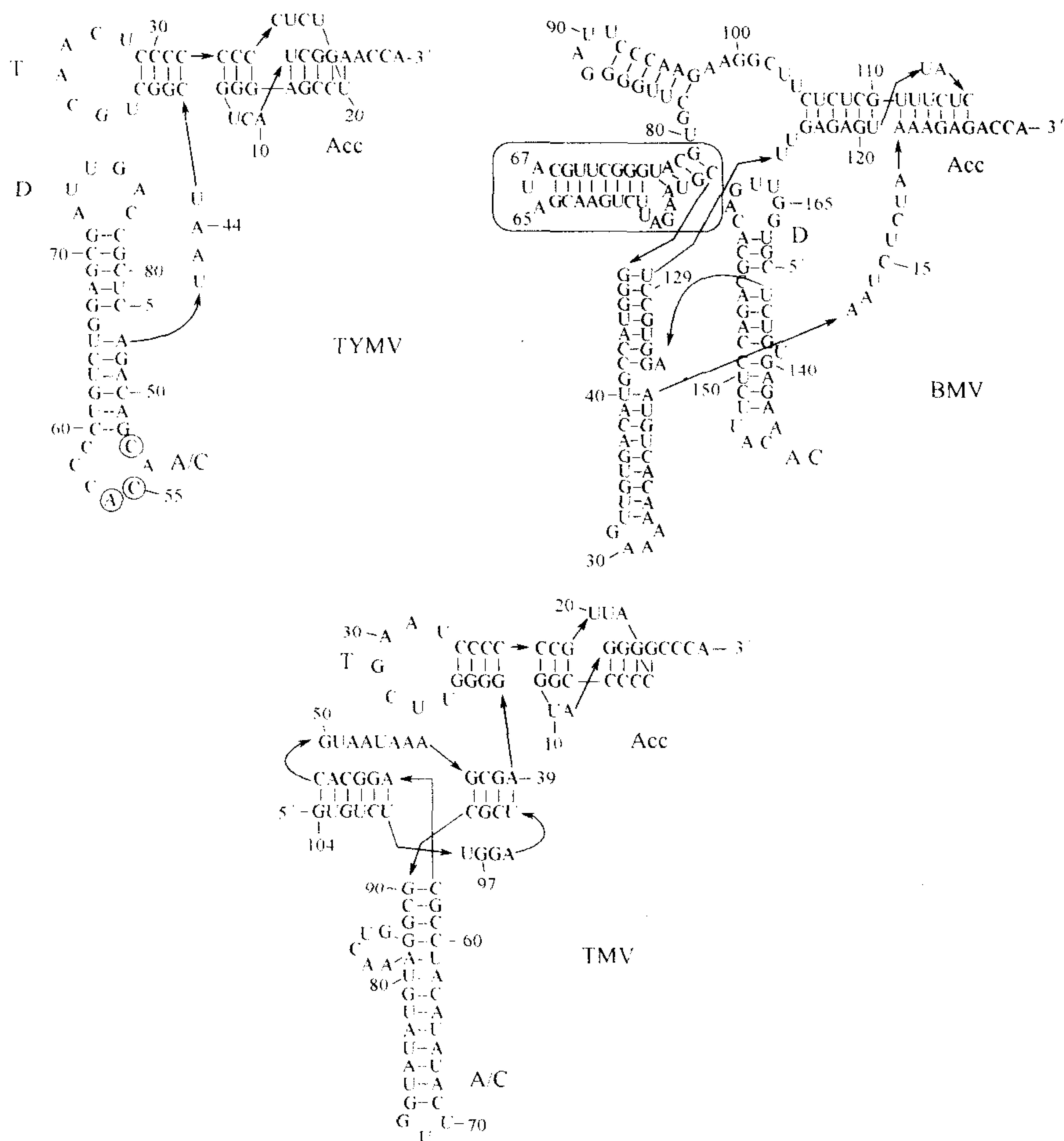


图 4.5　芜菁黄花叶病毒（TYMV）、雀麦花叶病毒（BMV）和烟草花叶病毒（TMV）RNA 的类似 tRNA 结构，分别代表了植物病毒 RNA 中发现的缬氨酸、酪氨酸和组氨酸这三种氨酰化特征。通过结构分析实验获得二级结构模型，该模型强调了病毒 RNA 与 tRNA 的整体相似性。在每一个病毒结构中，与规范 tRNA 相似的区域已在图中标出：ACC 氨酰基受体茎；T，TΨ 臂；D，D 臂；A/C，反密码子臂（注：BMV 的 D 臂和反密码子臂的命名为暂定性的）。TYMV RNA 中接受缬氨酸的特征性核苷酸用圆圈标注，BMV 结构中推断的 RdRp 识别元件用长方框标注。承蒙版权所有者（*Annual Review of Phytopathology*，Volume 37，© AnnualReviews. www. AnnualReviews. org）的惠允，引自 Dreher（1999）。

iv. 铯盐溶液中的有效浮力密度

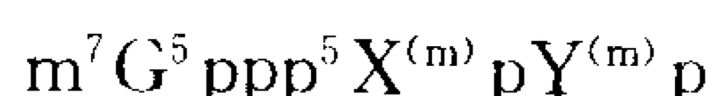
在适当的条件下，当 CsCl 或 Cs_2SO_4 的浓溶液用于离心时，高浓度的铯离子会通过沉降和扩散在离心管中重新分布形成一个密度梯度。如果有核酸的存在，则会在密度梯度中一个特定的位置形成区带。这个密度称为有效浮力密度，是确定病毒核酸特征和区分 RNA 与 DNA 的一个有用的标准。在 CsCl 溶液中，dsDNA 在密度为 1.69～1.71 g/cm^3 处形成区带。区带形成的确切位置取决于 DNA 的 G + C 含量。因此，该方法可用来区分碱基组成不同的 DNA。在相同条件下，RNA 则从梯度中沉淀下来。各种类型的核酸在 Cs_2SO_4 溶液形成的梯度中均能形成条带，dsDNA 在 1.42～1.44 g/cm^3 密度处形成区带；ssDNA 约为 1.49 g/cm^3；DNA-RNA 杂合子约为 1.56 g/cm^3；dsRNA 约为1.60 g/cm^3；ssRNA 约为 1.65 g/cm^3。如果使用溴化乙锭等荧光染料，由于染料可嵌入核酸分子，从而更容易对区带进行定位，此时核酸分子在较低密度处形成区带。

c. 末端基团结构

多种植物病毒 ssRNA 基因组的 5′端和 3′端含有特定的结构。本节对这些结构的特性进行总结，其生物学功能在第 6 章（第Ⅱ节 D）中讨论。

i. 5′ 帽子结构

多种哺乳动物细胞的 mRNA 和动物病毒的 mRNA 具有甲基化的、封闭的 5′端结构：



$$m^7G^5ppp^5X^{(m)}pY^{(m)}p$$

其中，$X^{(m)}$ 和 $Y^{(m)}$ 是两个甲基化碱基。

一些植物病毒具有这种称为“帽子”的 5′型端，但有些已知的植物病毒 RNA 中的碱基 X 和 Y 未被甲基化。RNA 具有 5′帽子结构的病毒组群将在第 6 章的基因组图中列出。

加帽（capping）活性由病毒编码（Dunigan and Zaitlin，1990）且与寄主的加帽活性不同（Merits *et al.*，1999）。关于病毒和细胞中参与帽子结构合成的酶类已有论述（Bisaillon and Lemay，1997）。现已证实，TMV 126 kDa 蛋白和 BMV RNA-1 编码的 1a 蛋白具有类似于甲病毒属病毒（alphaviruses）的加帽活性（Merits *et al.*，1999；Ahola and Ahlquist，1999；Kong *et al.*，1999）。这类活性利用 *S*-腺苷甲硫氨酸（adenosylmethionine，AdoMet）作为甲基的供体将 GTP 甲基化。这种鸟苷酸转移酶和转移酶活性对第 7 位的鸟嘌呤是特异性的，使其与 m^7GTP 形成一种共价复合体。因此，具有这种活性的酶称为甲基转移酶。

ii. 5′ 连锁蛋白

某些植物病毒属的成员基因组的 5′端与一个相当小的蛋白质（为 3.5～24 kDa）共价结合。这类蛋白质称为 VPg（与基因组连锁的病毒蛋白）。所有的 VPg 都由病毒编码，对大多数病毒而言，编码 VPg 的病毒基因已被鉴定（如 CPMV，参见第 6 章第Ⅷ节 B.1）。如果一个多分体 RNA 基因组具有 VPg，则其所有的基因组 RNA 都结合一个相同的 VPg 蛋白分子。VPg 通过一个磷酸二酯键与基因组 RNA 连接，而磷酸二酯键是在 VPg 氨基末端的丝氨酸或酪氨酸残基上的 β-OH 基团与基因组 RNA 5′端的尿（嘧啶核）苷（uridine）残基之间形成的（表 4.2）。

图 4.6 显示了 CPMV 的 VPg 由蛋白酶从一个长的前体上切割下来的过程。该蛋白

质的碱性（basic）性质在图中也有所体现。图 4.7 描述了 TRSV 基因组的尿嘧啶和 VPg 的丝氨酸之间的磷酸二酯键（Zalloua *et al.*，1996）。

表 4.2 植物病毒 VPg 的特性

病毒属	分子质量/kDa	连锁		是否侵染性所必需
		VPg	RNA	
豇豆花叶病毒属（*Comovirus*）	2	丝氨酸	尿苷	否
线虫传多面体病毒属（*Nepovirus*）	2～3	丝氨酸	尿苷	是
马铃薯 Y 病毒属（*Potyvirus*）	22～24	酪氨酸		否
南方菜豆花叶病毒属（*Sobemovirus*）	8～9	—	—	是
马铃薯卷叶病毒属（*Polerovirus*）	3	—	—	否
耳突花叶病毒属（*Enamovirus*）	3	—	—	否

数据引自：*Comovirus*，Eggen 和 van Kammen（1988）；*Nepovirus*，Zalloua 等（1996）；Wang 等（1999）；*Potyvirus*，Murphy 等（1991）；Murphy 等（1996）；*Sobemovirus*，van der Wilk 等（1998）；*Polerovirus*，van der Wilk 等（1997）；*Enamovirus*，Wobus 等（1998）。



图 4.6 豇豆花叶病毒（CPMV）VPg 的一级结构及其特征。VPg 是经 24 kDa 的蛋白酶分别在 Glu/Ser 和 Glu/Met 位点切割而从较长的前体上释放出来的。碱性和酸性氨基酸分别用符号“+”和“−”表示。经允许，引自 Jaegle 等（1987）。

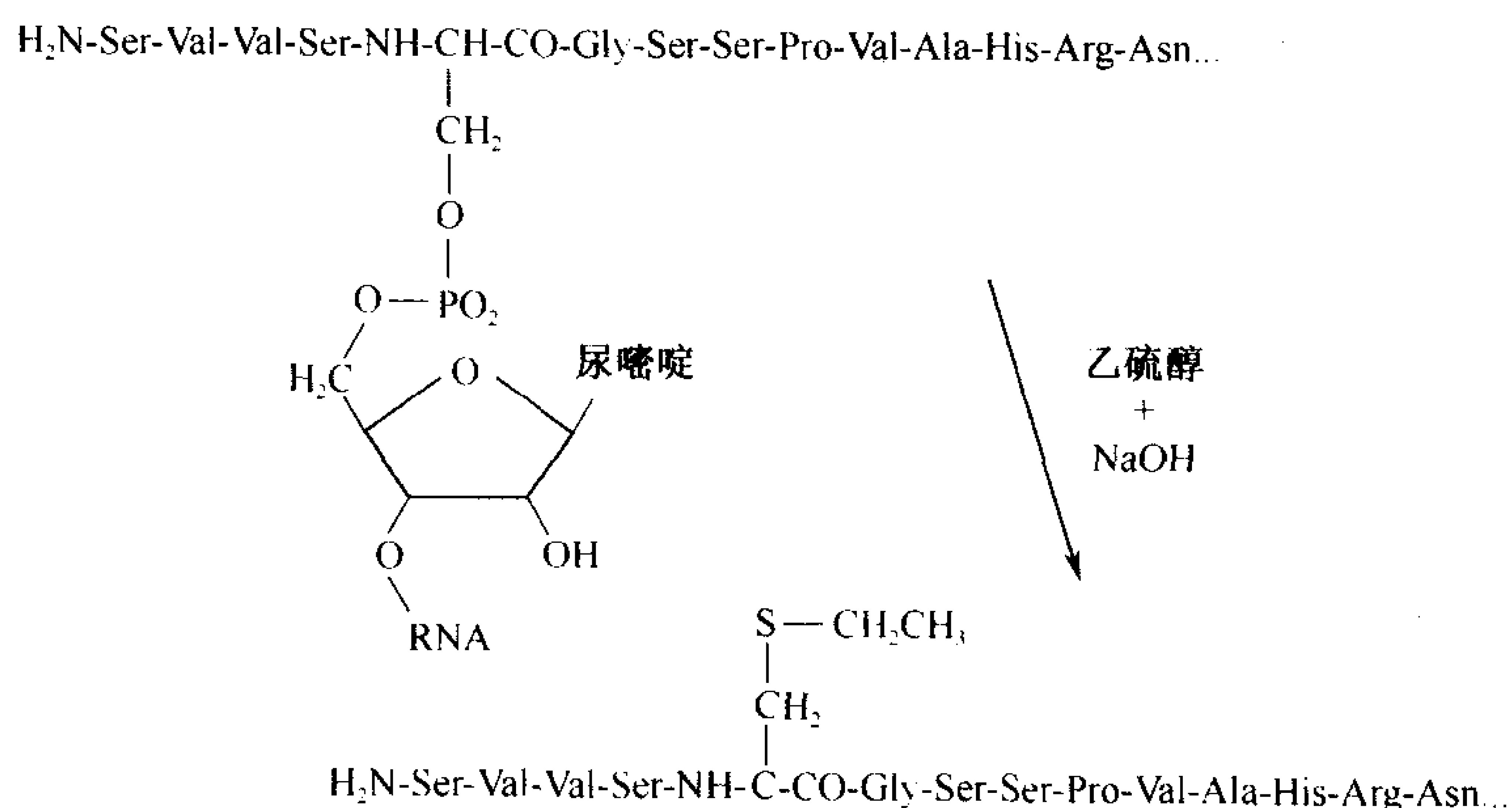


图 4.7 一个 VPg 以磷酸二酯键与烟草环斑病毒（TRSV）基因组 RNA 的 5′核苷酸残基连锁的示意图，以及在乙硫醇（ethanethiol）存在时经过一种碱（NaOH）催化的 β 消去反应（elimination reaction）后生成的产物。VPg 的氨基末端序列通过 Edman 降解法测定。VPg-5′-寡核苷酸经乙硫醇处理后得到 VPg 衍生物，在第 5 个循环可从中检测到一种 S-乙基半胱氨酸（ethylcysteine）残基。从这个结果推断，第 5 位应为一个丝氨酸，它通过一个磷酸二酯键与 TRSV 基因组 RNA 的 5′尿苷酸残基相连。经允许，引自 Zalloua 等（1996）。

根据与苹果酸脱氢酶中疏水-亲水残基分布的相似性，Plochocka 等（1996）提出了马铃薯 Y 病毒属病毒 VPg 的一个三维模型（图 4.8）。

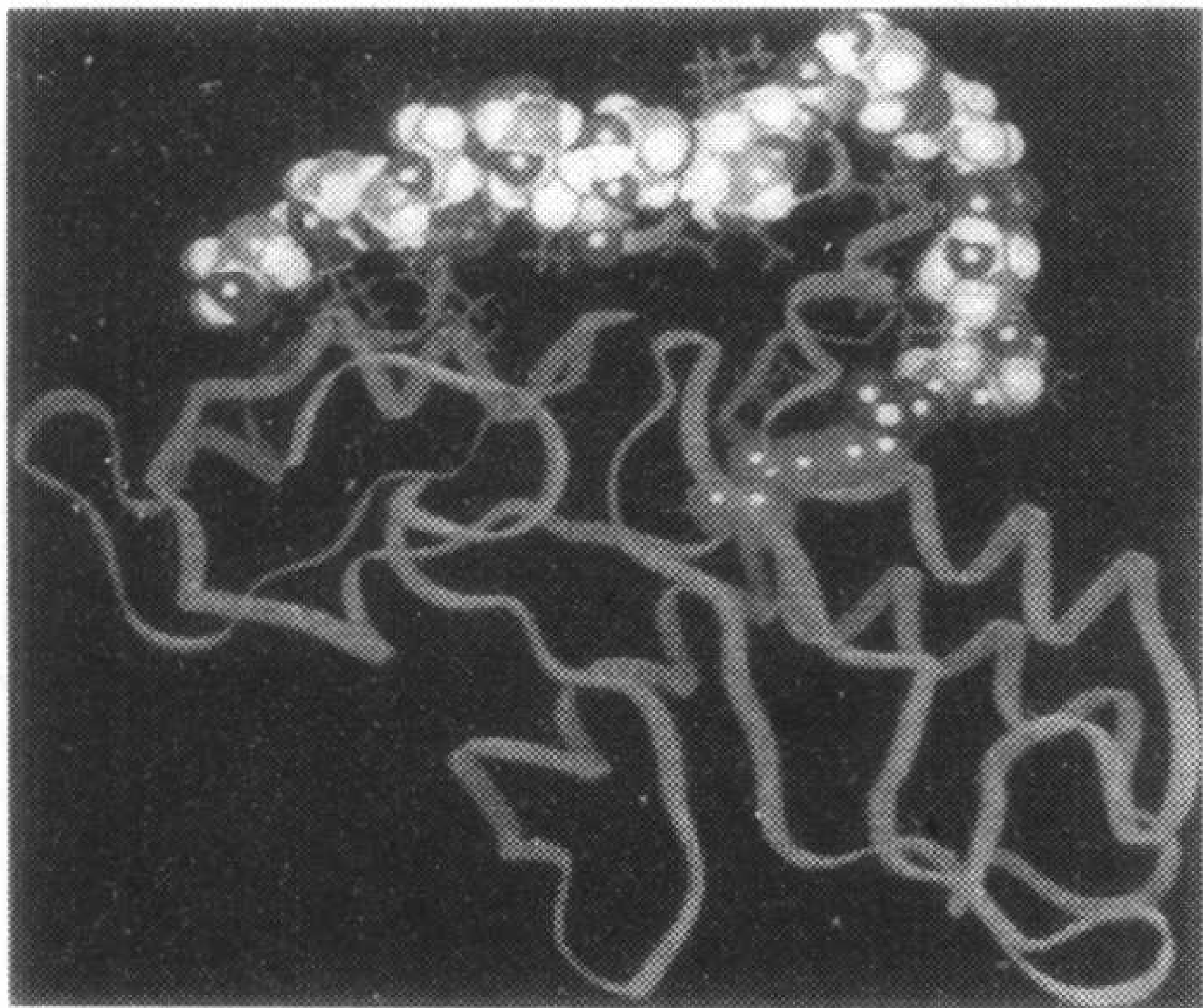


图 4.8　（见彩色图版 4.1）马铃薯 Y 病毒（PVY）的 VPg 与 RNA 片段相互作用的带状示意图（ribbon drawing）。RNA 主链和酪氨酸（Tyr）-64 以填满空间的（space-filling）方式来表示。蓝色代表那些与 RNA 紧密接触的侧链残基。承蒙版权所有者（© National Academy of Sciences）的惠允，引自 Plochocka 等（1996）。

Daubert 和 Bruening（1984）讨论了检测和确定 VPg 特性的方法。带有 VPg 的 RNA 可通过 Northern 与免疫印迹法得以分离（Margis *et al.*，1993）。

VPg 与病毒的复制有关（参见第 8 章第Ⅳ节 J）。

iii. 3′ poly（A）尾（Dreher，1999）

现已确定了多种真核生物 mRNA 3′端的多聚腺苷酸［poly（A）］序列。某些作为信使的植物病毒 RNA 的 3′端也发现了这种序列。第 6 章的基因组图中列出了 RNA 具有 3′ poly（A）尾的病毒属。在同一制备物中，不同的 RNA 分子的 poly（A）尾长度不同，而且这种差异似乎是一个普遍现象。例如，在 ClYMV RNA 中，poly（A）尾的长度范围为 75～100 个残基（AbouHaidar，1983）。对 CPMV 而言，B RNA 的 poly（A）的长度范围是 25～170 个残基，而 M RNA poly（A）的长度为 25～370 个残基（Ahlquist and Kaesberg，1979）。此外，雀麦花叶病毒属和大麦病毒属病毒基因组中还存在着内部 poly（A）。

iv. 3′ 类似 tRNA 的结构（Dreher，1999）

Pinck 等（1970）发现，将 TYMV RNA 与 ^{14}C 标记的各种氨基酸在适量的酵母或大肠杆菌的无细胞提取物中温育，TYMV RNA 能够结合缬氨酸，而缬氨酸由一个酯键连接于 3′端的腺苷之上。后来的工作表明，几种其他的芜菁黄花叶病毒属病毒也能接受缬氨酸（Pinck *et al.*，1975）。这种接受活性也存在于病毒 RNA 的双链复制型之中，在这种状态下 RNA 可抵抗 RNA 酶的攻击。这些实验表明，接受氨基酸是病毒正义 ssRNA的一种内在活性。

随后的工作证实，TMV 的典型株系和一些其他烟草花叶病毒属病毒 RNA 的 3′端可接受组氨酸（Litvak *et al.*，1973；García-Arenal，1988），BMV RNA 和 BSMV RNA 的 3′端可接受酪氨酸（Loesch-Fries and Hall，1982），CMV RNA 也可接受酪氨酸（Kohl and Hall，1974）。BSMV RNA 与其他病毒的不同之处在于：编码区末端和可接受酪氨酸的 3′类似 tRNA 序列之间有一个内部的 poly（A）（Agranovsky *et al.*，1981，1982，1983）。因此，现在已知的氨基酸特异性三类为：缬氨酸（芜菁黄花叶病毒属、真菌传杆状病毒属、马铃薯帚顶病毒属和烟草花叶病毒属中的菽麻花叶病毒-SHMV）、组氨酸（多数烟草花叶病毒属病毒）和酪氨酸（雀麦花叶病毒属、黄瓜花叶病毒属和大麦病毒属病毒）。

细胞的 tRNA 中会出现甲基化的嘌呤和假尿嘧啶，其中的一些碱基具有细胞分裂素活性。有关 TMV RNA 中存在细胞分裂素活性的推测尚未得到证实（Whenham and

Fraser，1982）。

第三种类似 tRNA 的 3′端结构是拟结（参见第Ⅲ节 A. 3. b）。这些类似 tRNA 结构的结构和功能在第 8 章第Ⅳ节 A. 1 部分进一步讨论。

v. 互补的 5′ 和 3′ 序列

番茄斑萎病毒属和纤细病毒属成员的 RNA 基因组片段在 5′端和 3′端含有互补序列，使得 RNA 末端退火形成“锅柄”（pan-handle）结构。这些结构在每个病毒属内成员的基因组片段中是保守的。三种番茄斑萎病毒属病毒的基因组具有一段 5′保守序列 AGAGCAAU…和一段 3′保守序列 UCUCGUUA…。纤细病毒属的 4 个基因组片段具有的保守序列为 5′-ACACAAAGUCC… 和 3′-UGUGUUUCAG…（Falk and Tsai，1998）。蛇状病毒属病毒（ophioviruses）的 RNA 呈环状，这说明其具有一个锅柄结构，但是两个末端之间是否互补还未得到证实（Milne *et al.*，2000）。

d. 侵染性

i. 历史背景

Gierer 和 Schramm（1956）使用一些标准证实了用酚法从病毒中提取的 TMV RNA 具有侵染性。RNA 制剂中具有侵染性的 RNA 比例很低，仅占完整病毒中与之等量的 RNA 的 0.1%。Fraenkel-Conrat 和 Williams（1955）的研究表明：虽然分离的 TMV RNA 的侵染性比完整病毒中的 RNA 低得多，但是当病毒蛋白亚基重新聚集在 RNA 周围形成病毒粒体之后，RNA 的侵染性有了极大的提高。将 TMV 一个株系的 RNA 与另一个株系的外壳蛋白在体外重新组合形成“杂种粒体”后接种寄主植物，后代病毒的蛋白质为所用的 RNA 编码产生（Fraenkel-Conrat，1956）。这是病毒 RNA 可决定外壳蛋白结构的强有力证据。基于这类经典的实验，现已从多种植物病毒中制备了具有侵染性的 RNA。以等量 RNA 进行比较研究发现，大多数植物病毒的 RNA 制剂的侵染性要比完整的病毒粒体低得多。相对于完整病毒粒体而言，RNA 的侵染力因制备方法、病毒种类和接种介质的不同而存在显著差异（如 CCMV，Wyatt and Kuhn，1977）。

ii. 结构要求

多种钝化实验证明，完整的 TMV RNA 分子为侵染性所必需，多核苷酸链中出现一处断裂就可导致侵染性的丧失。仅病毒 RNA 5′端或 3′端的碱基被化学修饰也会使其失去侵染力（Kohl and Hall，1977）。另一方面，对某些病毒 RNA 来说，与其 3′端共价相连的聚腺苷酸并非是侵染性所必需的。以 BSMV（Agranovsky *et al.*，1978）和 TEV（Hari *et al.*，1979）为例，缺少 poly（A）的 RNA 分子与具有完整 poly（A）的 RNA 的侵染力相同。

对某些病毒来讲，5′端的 VPg 是侵染性所必需的（如线虫传多面体病毒属；Mayo *et al.*，1982a；Hellen and Cooper，1987）。而对其他病毒而言则不是必需的（如豇豆花叶病毒属病毒和 TBSV；Mayo *et al.*，1982a）。

从 cDNA 转录出来缺少 5′帽子结构的全长 TMV RNA 转录物的侵染力要比带有帽子结构的分子低得多（Meshi *et al.*，1986）。同样，没有帽子结构的 BMV RNA 转录体的侵染力也比带有帽子结构的分子低（Janda *et al.*，1987）。

TMV（Jackson *et al.*，1971）和 CPMV（Shanks *et al.*，1985）的双链复制型 RNA 不具有侵染性。热变性可使这类 dsRNA 制剂恢复侵染能力，因为这样可使有侵

染性的正链从双链结构中释放出来。

利用克隆的病毒 DNA 可以获得侵染性的病毒 RNA 分子（Ahlquist *et al.*，1984b）。这项实验使得在基因组 RNA 任一端添加非病毒核苷酸以检测其效果成为可能。在 5′端加入一个额外的 G 残茎可使 BMV 转录物的侵染性降低为原来的 1/3，而添加 7 个或 16 个碱基便可显著降低其侵染性（Janda *et al.*，1987）。另一方面，在 BMV 或 TMV 的 3′端加入的非病毒碱基对侵染性影响不大，额外的碱基在子代病毒中被去除（Ahlquist *et al.*，1984b；Meshi *et al.*，1986）。

iii. 负链病毒

弹状病毒科成员的基因组为负单链 RNA，病毒粒体含有起始侵染所必需的一种病毒 RNA 聚合酶（转录酶）。因此，从这类病毒中分离的 RNA 不具有侵染性。同样，由于番茄斑萎病毒属和纤细病毒属病毒 RNA 主要是负义的，因而分离的 RNA 也没有侵染性。

iv. 多分体 ssRNA（基因组）病毒

这类病毒都需要一整套完整的基因组 RNA 以建立完全的侵染并产生子代病毒。然而，在有些二分体基因组病毒属中，较大的基因组 RNA 编码依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶。因此，这种 RNA 单独便可侵染细胞并自我复制，但不能产生病毒粒体，因为外壳蛋白基因在另一个基因组 RNA 上［如烟草脆裂病毒属病毒（Harrison and Nixon，1959）和线虫传多面体病毒属病毒（Robinson *et al.*，1980）］。虽然 CPMV 的 B 组分接种原生质体后可单独复制（Goldbach *et al.*，1980），但是不能在接种叶片上产生症状，也不能进行细胞间移动（Rezelman *et al.*，1982）。同样，在没有 RNA 3 存在时，BMV 和 CMV 的 RNA 1 和 RNA 2 也可复制，但是不能产生病毒粒体和进行细胞间移动（参见第 9 章第Ⅱ节 D. 2. e）。

AMV 和等轴不稳环斑病毒属病毒的基因组由 3 条 RNA 组成（RNA 1、RNA 2 和 RNA 3）。含有外壳蛋白基因的第四条小的 RNA 通常是由外壳蛋白包裹着的。3 条分离的基因组 RNA 不具有侵染性，因为接种物中需要一些外壳蛋白分子或者 RNA 4。在 3 条 RNA 中，每一条 RNA 都需要在一个特定的位点结合一个外壳蛋白分子以起始侵染。这种现象将在第 8 章第Ⅳ节 G 进一步讨论。

4. 双链 RNA 基因组

植物呼肠病毒的基因组含有 10 条或 12 条 dsRNA（参见第 6 章第Ⅵ节 A）。已经研究过的隐潜病毒（cryptoviruses）含有两个 dsRNA 片段（Accotto and Boccardo，1986）。碱基完全配对的双螺旋结构在高离子强度（>0.1 mol/L）、近于中性 pH 和低温条件下最稳定。在低离子强度、极端 pH 和高温条件下会失去双链结构（即结构解链），这一点将在第 15 章（第Ⅴ节 C. 1. a）讨论。根据一系列理化特性的差异可将dsRNA与 ssRNA 分开。二者间的多数差异是因为 dsRNA 比 ssRNA 的结构更加高度有序。

常用的一些理化特性如下：

a. 碱基组成

碱基组成符合 Watson-Crick 碱基互补原则，即 dsRNA 中腺嘌呤 = 尿嘧啶，鸟嘌呤 = 胞嘧啶。

b. X 射线衍射

由于存在高度有序的结构，因此有可能通过 X 射线衍射分析这类核酸的双链特性（Tomita and Rich，1964）。

c. 熔解曲线（melting profile）

水稻矮缩病毒（RDV）的基因组 dsRNA 具有一种锐利的、类似 DNA 的溶解曲线，解链温度 $T_m = 80℃$；将加热变性的 RDV RNA 快速冷却，其表现类似于核糖体和 tRNA（Miura *et al.*，1966）（图 4.9）。

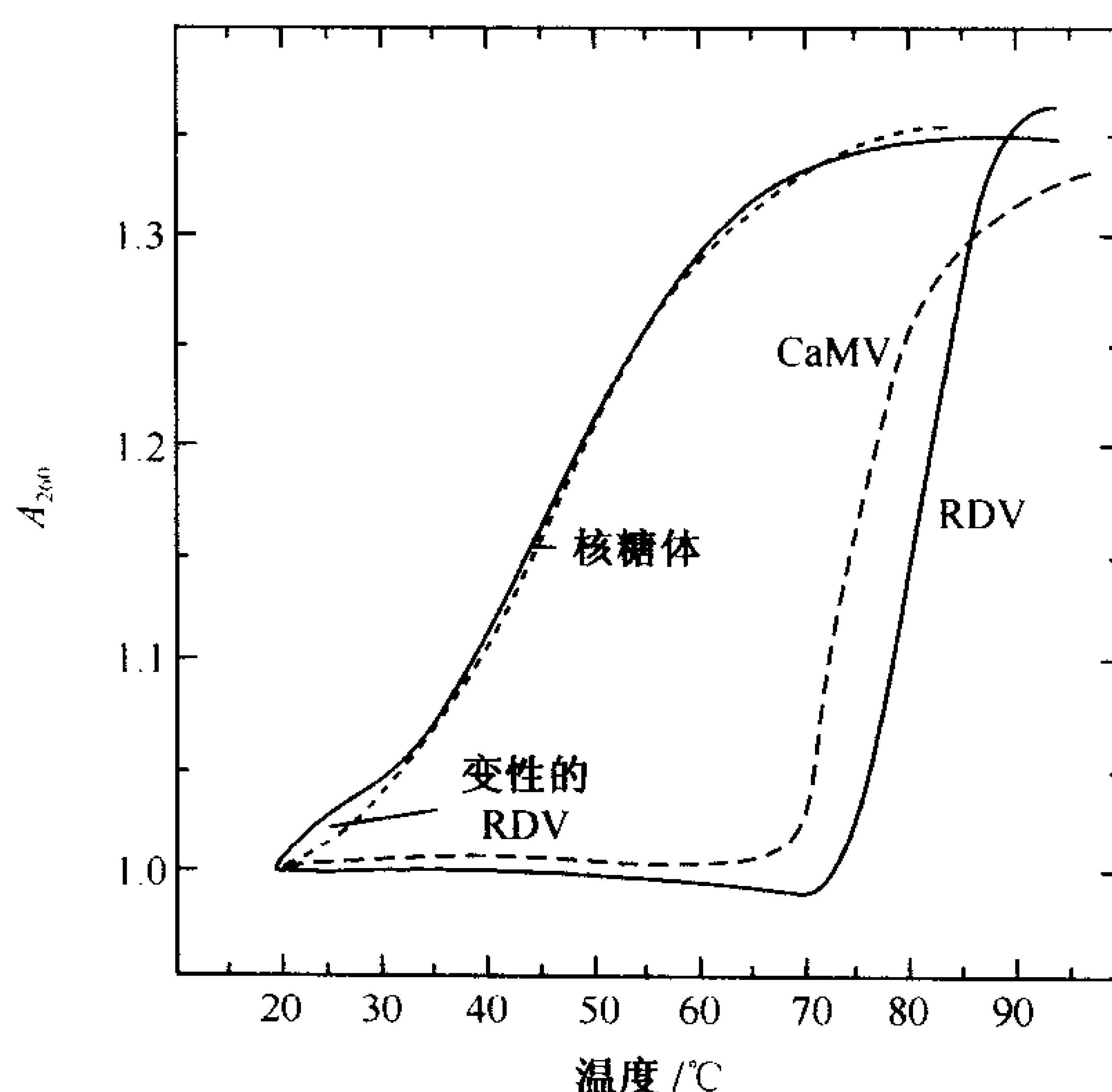


图 4.9 水稻矮缩病毒（RDV）的双链 RNA、核糖体 RNA 和变性的 RDV RNA 在 0.01×SSC 中的解链曲线（melting profile），以及 CaMV 的双链 DNA 在 0.1 × SSC 中的解链曲线［SSC = 0.15 mol/L NaCl 和 0.015 mol/L 柠檬酸钠（Na citrate)］。

d. 电子显微术

在电镜下检查经投影或染色处理的样品时，dsRNA 的外观与 dsDNA 相似。

e. 对 RNA 酶的抗性

在适当的 pH 和离子强度条件下，双链结构可使 RNA 的磷酸二酯骨架抵抗胰腺 RNA 酶的攻击。如果 dsRNA 在加热变性后快速冷却，则单链的 RNA 对 RNA 酶变得敏感。核酸样品在 260 nm 处吸光率的升高可作为判断其受 RNA 酶攻击程度的一个简便的方法。

f. Cs_2SO_4 中的浮力密度

dsRNA 在 Cs_2SO_4 梯度（约 1.60 g/cm^3）中具有典型的浮力密度。

g. 与甲醛的反应性

甲醛可以和核酸碱基的自由氨基基团发生反应。dsRNA 的氨基基团由于参与了氢键键合的碱基配对不与甲醛发生反应，而 ssRNA 在此条件下可与甲醛反应。这种差异可作为鉴定 dsRNA 的另一个标准（Ikegami and Francki，1975）。

h. 侵染性

分离出的呼肠病毒科病毒的 dsRNA 没有侵染性，因为它不带有完整病毒粒体所包

含的一种 RNA 聚合酶。在侵染的早期，此酶以病毒的基因组负链为模板合成正链。

5. 双链 DNA 基因组

花椰菜花叶病毒科成员是目前已知的唯一一类具有 dsDNA 基因组的植物病毒。基因组约为 7.5～8 kb。一种植物病毒中可以含有 DNA，Shepherd 等（1968）有关 CaMV 的研究首次对此提供了很好的证据。判定 CaMV 的核酸为 DNA 主要基于以下特性：①二苯胺（diphenylamine）反应呈阳性；②存在胸腺嘧啶（thymine）；③从病毒中分离出的核酸的侵染性可被胰腺 DNA 酶（pancreatic DNase）破坏，但是不受 RNA 酶（RNase）的影响；④在氯化铯（CsCl）中对提纯病毒进行平衡密度梯度离心时，通过二苯胺检测到的 DNA（或者 260 nm 处存在吸收的材料）和侵染性成分在梯度中处于同一区带位置。

进一步的工作表明这种 DNA 为双链，因为它具有典型的 dsDNA 熔解曲线（melting profile）（图 4.9），同时其碱基组成为 G = C 和 A = T（Shepherd *et al.*，1970）。

从 CaMV 中分离出来的 DNA 经凝胶电泳和电镜检查可发现多种构型（Ménissier *et al.*，1983），其中最多的是开环，但也有单结和多结形式（图 4.10）。

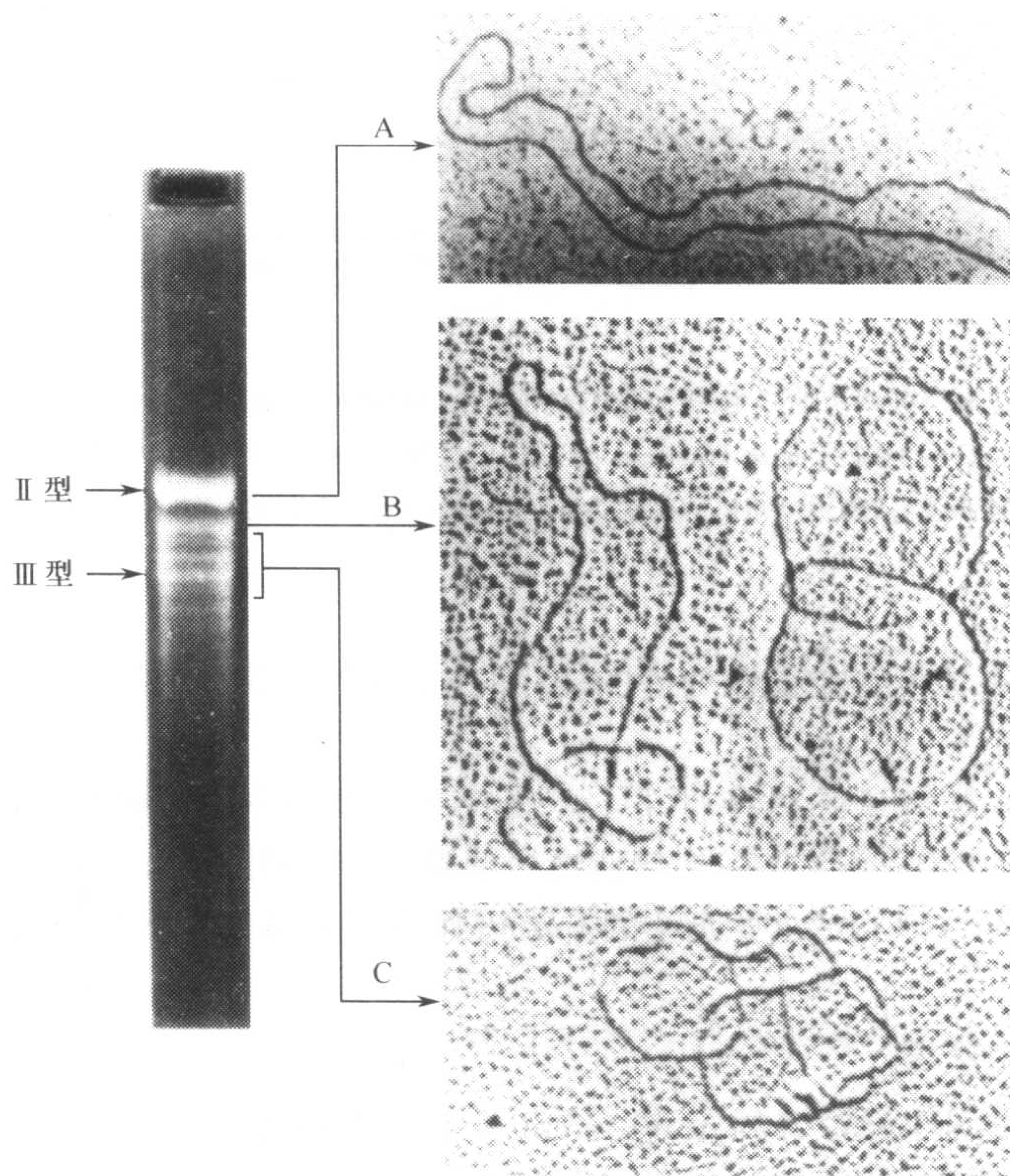


图 4.10　“扭结的”CaMV DNA。从病毒粒体中提取的 1 μg DNA，在 1%琼脂糖凝胶中以 30 V 电压电泳 16 h 后，将凝胶于溴化乙锭（0.5 μg/ml）中染色并在紫外灯下观察。通过电泳分离凝胶中不同部位的 DNA 并对其进行电镜观察。区带 A 对应于环状 DNA 分子，区带 B 对应于单结的（singly knotted）分子，区带 C 对应于高度扭结的环状 DNA。线形 DNA 分子有时也会形成扭结，并可以检测到（此图未展示）。承蒙版权所有者（Oxford University Press）的惠允，引自 Menissier 等（1983）。

基因组 DNA 两条链都含有单链不连续区（discontinuity）或缺口。现已发现，花椰菜花叶病毒科的所有成员的一条链上都存在一个单独的不连续区。不同的病毒在第二条链上含有一、二或三个单链不连续区。含有一个不连续区的链称为 α 链或负链。在每个不连续区处，各个断裂链的 5′端和 3′ 端发生不同程度的重叠，范围从 8～20 个核苷酸不等（Richards *et al.*，1981）。有关这些不连续区的细节将在第 8 章（第Ⅶ节 B. 3）介绍。

在 CaMV 和 RTBV 粒子中还发现了一个小的 ssDNA 片段，其 5′ 端有一个 75 核苷酸的 RNA 与之共价相连（Turner and Covey，1984；Bao and Hull，1993），这种 RNA 具有寄主植物 $tRNA^{met}$的特性。组成 CaMV 基因组的多条单链在其 5′ 端均有一个或多个核糖核苷酸与之共价相连（Guilley *et al.*，1983）。这些 RNA 是参与复制的引物或引物残体（参见第 8 章第Ⅶ节 B）。分离的 CaMV DNA 可以侵染芜菁植株（Howell *et al.*，1980）和原生质体（Yamaoka *et al.*，1982a）。

6. 单链 DNA 基因组

两个植物病毒科——双生病毒科（*Geminiviridae*）和矮缩病毒科（*Nanovimidae*）含有单链 DNA 基因组。有些双生病毒基因组是一个单一的共价闭合环，大小为 2. 5～3. 0 kb。其他双生病毒的基因组含有两个大小相同的环，通常被称为 DNAs 1 和 DNAs 2 或者 A 和 B（参见第 6 章第Ⅴ节 A. 4）。矮缩病毒科病毒（nanoviruses）含有 6 个或更多小的环形 ssDNA，每个分子大小约为 1 kb（参见第 6 章第Ⅴ节 B. 1）。

玉米线条病毒（MSV）中包装的单一环状基因组 DNA 有一部分是双链的，因为有一条 70～80 nt 的短链与之配对。这条短链有一个或数个核糖核苷酸构成的帽子（Howell，1984）。ACMV 基因组由两个环状 ssDNA 组成。除了这两个分子外，由病毒制备的 DNA 制剂还含有少量其他 DNA 分子，其长度分别为基因组 DNA 的 2 倍和大约 1/2（Stanley and Townsend，1985）。其中二聚体 DNA 参与基因组的复制循环（参见第 8 章第Ⅷ节 C），而小的 DNA 分子来自于一条基因组链，它可能是 DI 分子（参见第 8 章第Ⅸ节 C. 4）。

Goodman（1977a）证实，分离的双生病毒 DNA 具有侵染性。Stanley（1983）用克隆的 DNA 证明 ACMV 的两条 DNA 分子是侵染性所必需的，而且病毒在植物体内运动也需要两个分子的参与。然而其中的一条 DNA（DNA1）可在原生质体中单独复制，但是不能在植株中系统运动（Davies *et al.*，1987a）。通过克隆 DNA 实验表明，MSV 的单个 ssDNA 分子具有侵染性并构成完整的病毒基因组（Lazarowitz，1988）。

7. 核苷酸序列

20 世纪 70 年代，通过对 RNA 片段直接测序确定了一些植物病毒的 5′端和 3′端的核苷酸序列。第一个完成全序列测定的植物病毒基因组是 CaMV 的 DNA（Franck *et al.*，1980）。通过建立覆盖病毒 RNA 基因组全部信息的 cDNA 文库，可以将 DNA 测序方法用于 RNA 核苷酸全序列的测定。第一个测定的 RNA 全序列的病毒为 TMV（Goelet *et al.*，1982）。自此以后，许多其他的植物病毒 RNA 基因组也完成了全序列的测定（参见第 6 章）。尤为重要的是，建立了反向遗传学系统，即将 RNA 病毒的cDNA克隆在体外转录产

生在活体内具有完全侵染力的 RNA 拷贝（Ahlquist *et al.*，1984b)。

通过序列数据库可以搜索到多种植物病毒的核酸序列。Ausubel 等（1987，1988）详述了序列测定的程序。第 6～8 章将对核酸序列的功能加以讨论。

B. 蛋白质

大多数小的几何体（geometric）植物病毒以 ssRNA 作为遗传物质，其病毒粒体仅含有一种蛋白亚基。在有些基因组为正义 ssRNA 的病毒中，衣壳的基本结构由两种外壳蛋白组成（如豇豆花叶病毒属病毒)。在其他病毒中，有些外壳蛋白亚基可能是主要外壳蛋白分子的变体，它们通常与病毒的介体相互作用（参见第 11 章)。双生病毒和花椰菜花叶病毒科病毒均含有一种外壳蛋白，但这种蛋白质经末端修饰后可产生两种或多种蛋白质分子的表象。侵染植物的呼肠病毒科与纤细病毒属病毒和一些较大的具有包膜的植物病毒含有几种不同的蛋白质，其中有些是酶类；如第 7 章第 Ⅳ 节 A 所述，这些病毒需要一种聚合酶的存在以建立侵染。

现已发现，植物病毒外壳蛋白也由 20 种氨基酸（或者其中的一部分）组成，这一点与其他生物材料中的发现相似，而且氨基酸的平均比例也表现出大致相同的趋势。如半胱氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸的数量较少。

1. 从病毒制剂中分离

许多分离病毒 RNA 的条件和试剂也可用于病毒蛋白的制备，而且分离的蛋白质基本上不含 RNA。然而在通常情况下，从一种特定病毒中获得完整 RNA 的最好方法与制备令人满意的蛋白质制剂的方法还是有区别的。蛋白质的分离通常用于其特性的确定以及病毒装配方面的研究。

a. 去污剂

随着聚丙烯酰胺凝胶电泳的应用，在 SDS 中裂解病毒样品已成为从病毒中非共价连接的多肽制备单体的常用方法。

b. 酸

Fraenkel-Conrat（1957）描述了一种使用冷的 67%乙酸处理 TMV 来分离蛋白亚基的简单而有效的方法，此方法的效果因病毒株系的不同而异。通过这种方法分离的 TMV 蛋白呈天然状态，可用于病毒粒体的重新装配（参见第 5 章第Ⅳ节 A)。令人遗憾的是，乙酸法对大多数其他病毒并不适用。

c. 强盐溶液

BBMV（Yamazaki and Kaesberg，1963a）和 BMV（Yamazaki and Kaesberg，1963b）的蛋白质外壳可在 1 mol/L $CaCl_2$中解离和溶解。对 BMV 而言，沉淀分析结果表明产物似乎是化学亚基的一种相当稳定的二聚体。一个简单的方法就是使用 1 mol/L NaCl 制备可以和 RNA 组合产生侵染性病毒粒体的蛋白亚基（Hiebert *et al.*，1968)。对有些病毒来说，用 LiCl 代替 $CaCl_2$能够得到质量更高的产物（Moghal and Francki，1976)。

2. 蛋白质产物的性质

分离蛋白质的理化状态因病毒种类和处理方法的不同而有很大差异。下面将对产物

的类型进行讨论。

a. 病毒蛋白外壳

病毒蛋白外壳指未包裹 RNA 的病毒粒体（如 TYMV）（中空的粒子）。

b. 亚基

亚基的存在状态包括自然形态和各阶段的聚集态。例如，CCMV 和 STNV（Rice，1974）中存在着次要组分（占总蛋白质的数个百分点）。根据其大小和组成，这些组分应为外壳蛋白的二聚体。化学方面的证据表明，这些二聚体之间是以非二硫键的共价键相连的。

相邻的外壳蛋白分子有时不能解离成单体，是因为这些分子之间形成强键的缘故。外壳蛋白可形成稳定的二聚体。南方菜豆花叶病毒属病毒就是很好的例子，通过凝胶电泳可观察到一条副带，其分子质量是主要外壳蛋白的 2 倍（Sehgal and Hsu，1997）。

c. 可逆变性的亚基（reversibly denatured subunit）

Anderer（1959）发现，TMV 经苯酚处理后产生变性的蛋白质，但是如果用甲醇将变性的蛋白从苯酚中沉淀下来，然后经过 60℃ 热处理并使 pH 保持在 7.0～7.5，变性的蛋白质可复原为具有全部功能的蛋白亚基。

d. 不可逆变性的聚集体（irreversibly denatured aggregate）

不可逆变性的聚集体在水性介质中是不溶的。不溶聚集体出现的一个主要原因是巯基的氧化使半胱氨酸残基之间形成交联的二硫桥。可用多种方法阻断这种交联，其中常用的是还原剂。

e. 部分降解的蛋白质

在从植物中分离病毒或者后续的保存过程中，病毒粒体中的某些蛋白亚基可能在特异的位点被切割。例如，Koenig 等（1978）证实，完整的 PVX 粒子中的蛋白质可被植物粗提液中依赖于还原剂的蛋白酶从 N 端部分降解，而 C 端则被存在于病毒制剂中的一些不依赖于还原剂的蛋白酶降解。

至于病毒粒体中蛋白亚基的“真正”大小，酶的降解作用可能使其具有不确定性。如多数南方菜豆花叶病毒属病毒含有一种外壳蛋白。然而，在该病毒属的某些成员中发现了一种以上的蛋白质分子。因此，解离后的 VTMoV 会产生大小约为 37 kDa、33 kDa和 31.5 kDa 的蛋白质。Chu 和 Francki（1983）认为，33 kDa 蛋白质是 37 kDa 蛋白质在失去 40 个氨基酸之后形成的一种不稳定的中间体，在此基础上继续失去大约 15 个氨基酸后则产生 31.5 kDa 蛋白质。相关的 SNMoV 含有一种约为 31 kDa 的蛋白质。蛋白质的大小从 37 kDa 减少到 31.5 kDa 是否为一个生物学上的重要事件或者仅仅是在分离过程中形成的假象，目前尚不清楚（Kibertis and Zimmern，1984）。

f. 与一种寄主蛋白共价结合的外壳蛋白

一种更罕见的情形是 TMV U_1 株系含有的一种分子质量约为 26.5 kDa 的蛋白质，而且每个病毒粒体仅含有一个这样的蛋白质分子。该蛋白质含有 TMV 外壳蛋白的大部分氨基酸序列和非病毒序列（Collmer and Zaidin，1983）。这个蛋白质称为 H 蛋白，在与外壳蛋白和 RNA 在体外混合后可重新装配进入 TMV U_1 的杆状粒子中（Collmer *et al.*，1983）。氨基酸测序和免疫交互反应结果表明，H 蛋白中源于寄主的组分为泛蛋白（ubiquitin），可能连接于 TMV 外壳蛋白的第 53 位赖氨酸上（Dunigan *et al.*，1988）。

泛蛋白是一种存在于所有的真核生物中的一种小的蛋白质（76 个氨基酸），在不同生物类群间其氨基酸序列具有高度的保守性。泛蛋白与 TMV 结合的重要性尚不清楚，但是 Dunigan 等（1988）认为这可能是植物的一种胁迫反应。

3. 大小的确定（size determination）

有关核酸大小的术语的解释（参见第Ⅲ节 A. 2）也可用于蛋白质分子大小的描述。然而在实际工作中，蛋白质的大小常用千道尔顿（kDa）表示。

大多数植物病毒外壳多肽的分子质量为 17～40 kDa。这个大小范围处于高等植物中所发现的大多数多肽的分子质量范围的下游。沉淀-扩散测量法对外壳蛋白这么小的分子难以应用。目前确定分子质量最常用的方法为 SDS-PAGE 和氨基酸序列推算法。

a. 聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）

近年来，最通用的方法是在含有 SDS 和尿素的聚丙烯酰胺凝胶中进行病毒蛋白质的电泳分析。目标蛋白质的分子质量通过参照已知分子质量标准蛋白的迁移率来估测。这种方法的突出优点是它的简易性、蛋白质的需要量小和易于将蛋白质混合物分离。

然而，也必须考虑到此方法的一些限制因素。首先，分子质量的估测值有 5%～10%的内在误差。其次，这种方法主要基于如下假定：①未知蛋白质和标准蛋白质在凝胶中具有相同的构型；②所有蛋白质都结合等量的 SDS（约 1.4 g/g 蛋白质）；③由于所有的蛋白质结合等量的 SDS，它们都有一种相似的电荷/质量比。不同的蛋白质不会结合等量的 SDS。有时还会出现一些反常的情形，即在不同的凝胶浓度中分子质量的估测值不同（Ghabrial and Lister，1973；Shepherd，1976；Hammond and Hull，1981）。这类反常的偏离可通过一种 Ferguson 曲线校正（Hedrick and Smith，1968；Hammond and Hull，1981）。

即使只存在一种外壳蛋白分子，外壳蛋白有时也会形成两条带（如 TYMV 蛋白的表观大小为 20.1 kDa 和 21.7 kDa；Matthews，1974）。在一种蛋白质的特定末端进行替换可能导致表观分子质量发生意想不到的变化。例如，TYMV 蛋白经羧甲基化之后其表观分子质量为 23.2 kDa（Matthews，1974）。出现这种情形可能是因为多肽具有不同的构型，而且它们对 SDS 的结合也存在差异，但是详细情况还不清楚。

b. 化学法

全部氨基酸序列确定之后，对分子质量的计算也就更为准确。在缺少序列分析的情况下，将氨基酸分析和胰蛋白酶肽作图（tryptic peptide mapping）、溴化氰片段（cyanogen bromide fragment）作图或者末端基团（end group）分析法相结合可得出分子质量大小的估测值。然而，单独使用这些方法可能会得出错误的结果（Gibbs and McIntyre，1970）。

4. 氨基酸序列

Fraenkel-Conrat 和同事（Tsugita *et al.*，1960）及 Anderer 等（1960）确定了 TMV 外壳蛋白的一级结构。科学家们曾一度被研究技术和结果解析方面存在的诸多困难所困扰，而 158 个氨基酸全序列的测定成为取得实质性研究成就的代表。有关 TMV 外壳蛋白氨基酸序列的知识在研究中具有十分重要的价值，因为可通过病毒突变体外壳

蛋白氨基酸序列的变化获知 RNA 中相应的碱基变化。这些研究进一步证实了遗传密码的本质及其通用性。

在 20 世纪 70 年代，一些外壳蛋白的部分或全部氨基酸序列已通过直接化学法得以确定。然而，随着将 RNA 基因组复制为 DNA 技术和相应的快速测序技术的建立，现已证明根据基因的核苷酸序列确定其编码的蛋白质的氨基酸序列是一种比较简便而快捷的方法。这种策略在植物病毒蛋白上的应用始于 20 世纪 80 年代早期（如对 STNV 和 BMV 外壳蛋白的研究，Ysebaert *et al.*，1980；Ahlquist *et al.*，1981a）。目前，大多数（而非全部）植物病毒属代表成员的外壳蛋白氨基酸全序列都已确定。

有时可通过与已知的相关病毒进行比较，再根据基因的大小及其在基因组中的位置来确认外壳蛋白基因。然而，一致性的证据可通过如下方法获得：以化学法测定外壳蛋白某处的 20～30 个氨基酸序列，然后将此序列和适宜的核苷酸序列匹配（Carrington *et al.*，1987，对 TCV 外壳蛋白的研究）。

5. 二级和三级结构

能够提供二级和三级结构信息的多种理化技术已应用于植物病毒外壳蛋白的研究。如果要确定一个完整的三维结构，必须清楚蛋白质的氨基酸序列和晶体形态，后者可利用高分辨率 X 射线结晶技术获得。氨基酸序列化学方面的有关知识对于模型的建立非常重要，在对 X 射线晶体分析数据进行三维解析时，模型可以起到辅助作用。另外，如果知道数个相关蛋白质的序列，则可以确定特别重要的氨基酸残基（图 2.5）。其他的理化技术可以提供具有指导性或者验证性的信息。

a. X 射线结晶学

对某些病毒而言，X 射线分析是揭示外壳蛋白三维结构的一种关键技术。在第 5 章中将以病毒为一个整体对这些结构进行总体讨论。如果已知两种或多种相关病毒外壳蛋白的一级序列，可通过计算机辅助方法预测蛋白质的三级结构（Sawyer *et al.*，1987）。这种预测可以提供有用的信息，但是并不能取代详细的 X 射线分析。

b. 其他物理学技术

许多其他的物理学技术也已用于病毒外壳蛋白结构的研究。利用这些技术可以获得建立低分辨率模型的信息。例如，Kan 等（1982）根据质子磁共振（proton magnetic resonance）数据提出了 AMV 外壳蛋白的低分辨率模型。AMV 外壳蛋白由一个刚性的芯和大约 36 个氨基酸的柔韧的 N 端臂（大约 36 个氨基酸）组成。其他的例子将在第 5 章中讲述。

c. 暴露在蛋白质或完整病毒表面的残基

特定的氨基酸是否位于蛋白亚基或者完整病毒的表面，有可能通过使用特殊的酶、化学试剂或者抗体获得相关证据。例如，羧肽酶 A（carboxypeptidase A）可消化掉暴露于 TMV C 端表面的苏氨酸残基（Harris and Knight，1955）。在 TMV 蛋白质的 15 个侧链的羧酸基团中，只有 3 个（在 64 位和 66 位残基和 C 端残基）容易和碳二亚胺（carbodiimide）反应，因此可判断它们位于或接近病毒的表面（King and Leberman，1973）。

生化证据和免疫研究表明，马铃薯 Y 病毒属病毒外壳蛋白的亲水性 N 端区域位于

病毒的表面（Allison *et al.*，1985b）（参见第 17 章第Ⅱ节 B. 4）

第 15 章（第Ⅳ节 D）和 Kekuda 等的综述（1995）讨论使用单克隆抗体鉴定病毒粒体表面的残基。

d. 添加到蛋白质结构上的基团

许多植物病毒的外壳蛋白看来完全由未经修饰的多肽组成。而在其他病毒中，蛋白质合成后会添加多种基团。如 CaMV 的外壳蛋白被磷酸化（Hahn and Shepherd，1980）和糖基化（Du Plessis and Smith，1981）。Lee 等（1972）提供的间接证据表明 SYVV 的表面存在着甘露糖胺丙酮酸（neuraminic acid）或某种相关化合物。

Partridge 等（1976）证实，BSMV 外壳蛋白上结合着多种糖类物质，包括葡萄糖、甘露糖、木糖、半乳糖胺和葡萄糖胺。BSMV 的外壳蛋白经链霉蛋白酶消化后产生一个三肽，Gly-Asp-Ala（甘氨酸-天冬氨酸-丙氨酸），它通过与天冬酰胺形成的一个酰胺键与碳水化合物结合（Gumpf *et al.*，1977）。

e. 多肽链折叠的问题

蛋白质生物合成结束后，一级多肽链必须经过正确地折叠才能形成功能上、正确的三维结构。Anfinsen（1973）指出，溶液中一个含有 149 个氨基酸的多肽链在理论上可以有 4^{149}～9^{149}种不同的构型。因此，产生正确结构的蛋白质折叠一定是发生于有限数目的起始事件。

目前已有越来越多的计算机程序可用于蛋白质二级结构的预测。虽然对诸如 α 螺旋、β 折叠和随机结构区的推测相当可靠，但是对于这些结构如何装配成三级结构的推测还有待提高。

6. 病毒粒体中的酶和其他非外壳蛋白

a. 花椰菜花叶病毒属病毒（caulimoviruses）

已有研究表明，病毒粒体中由一种 76 kDa 的酶和病毒 DNA 组成的复合体具有 DNA 聚合酶活性（Ménissier *et al.*，1984）。CaMV 还含有一种内源的蛋白激酶活性。发生磷酸化作用的主要是外壳蛋白和两个较大的蛋白质。丝氨酸和苏氨酸是发生磷酸化作用的残基（Ménissier de Murcia *et al.*，1986；Martinez-Izquierdo and Hohn，1987）。

b. 呼肠病毒科（*Reoviridae*）

通过与感染动物的呼肠病毒类比发现，侵染植物的呼肠病毒成员的粒体内含有一种依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（RdRp）。这种活性已在某些植物呼肠病毒制备物中检测到，包括 RRSV 和 RBSDV（Uyeda *et al.*，1987b）。另外，某些病毒如 RRSV（Hagiwara *et al.*，1986）含有 5 个或者可能更多的结构多肽。细节将在第 5 章第Ⅶ节中病毒结构的相关部分进行讨论。

c. 隐潜病毒（cryptoviruses）

CCV-1 含有一种 RdRp 活性，是一种促进双链基因组 RNA 合成的复制酶（Marzachi *et al.*，1988）。

d. 弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）

一种将病毒负链 RNA 转录为 mRNA 的 RdRp 已在动物弹状病毒中发现。类似的酶应该也存在于同科的植物病毒中。这种 RdRp 活性在 LNYV（Francki and Randles，

1972）和 BNYV（Toriyama and Peters，1981）制剂中已经发现。与感染动物的弹状病毒科成员相似，植物弹状病毒也含有几种结构蛋白（参见第 5 章第Ⅷ节 A)。

e. 番茄斑萎病毒（tomato spotted wilt tospovirus）

番茄斑萎病毒粒体含有 3 种主要的结构蛋白和少量的聚合酶分子（参见第 5 章第Ⅷ节 B)。

f. 纤细病毒属病毒（tenuiviruses）

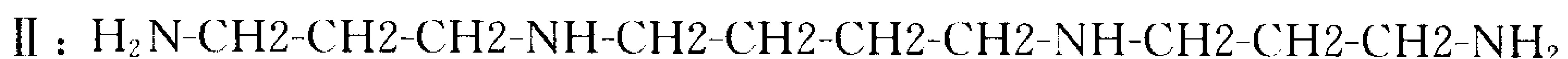
RSV 的丝状核蛋白粒体中含有一种 RdRp（Toriyama，1986a)。

C. 病毒中的其他组分

1. 多胺

Johnson 和 Markham（1962）的研究证明，TYMV 制剂中含有一种多胺。将 TYMV 分解为 RNA 和蛋白质时，发现约有 2/3 的胺和 RNA 在一起。Johnson 和 Markham 认为在完整的病毒中，胺主要与 RNA 结合。Beer 和 Kosuge（1970）确定多胺是一种亚精胺（spermidine）（Ⅰ）和精胺（spermine）（Ⅱ）的混合物，其中亚精胺约占 TYMV 重量的 1.0%，亚精胺仅占 0.04%。这足以中和病毒中大约 20%的 RNA 磷酸基团。


Ⅰ：$H_2N\text{-}CH2\text{-}CH2\text{-}CH2\text{-}NH\text{-}CH2\text{-}CH2\text{-}CH2\text{-}CH2\text{-}NH_2$


Ⅱ：$H_2N\text{-}CH2\text{-}CH2\text{-}CH2\text{-}NH\text{-}CH2\text{-}CH2\text{-}CH2\text{-}CH2\text{-}NH\text{-}CH2\text{-}CH2\text{-}CH2\text{-}NH_2$

这些胺类广泛存在于植物和动物组织当中，这一点已经明确。亚精胺存在于未受侵染的大白菜中，TYMV 的侵染可使亚精胺的量升高（Beer and Kosuge，1970)。虽然 TYMV 的蛋白外壳能够可逆性地吸附少量的多胺，但是多胺不能渗透到外壳内。病毒不能交换或者泄漏粒体内的多胺（Cohen and Greenberg，1981)。被包入病毒粒体时或者在此之前，病毒中的多胺便与 RNA 结合在一起。

利用一种改进的、包括 HPLC 的多胺测定方法，Torrigiani 等（1995）发现 TMV 含有腐胺、亚精胺和精胺，这几种胺类物质占病毒粒体重量的 0.0022%，可以中和 RNA 分子中 0.3%的磷酸残基。

并非所有小的植物病毒都含有这些胺类物质。CPMV 中的亚精胺占粒体重量的 1%，然而在 BSMV 和三种雀麦花叶病毒属病毒中未发现多胺（Nickerson and Lane，1977)。

2. 脂类

几乎可以断定，所有具有双层包膜的病毒都含有脂质。对一些具有包膜的病毒已经做过有关脂质的分析。从心叶烟（*N. glutinosa*）获得的 TSWV 制剂含有 19%的脂质（Best and Katekar，1964)。从黄花叶（*N. rustica*）中分离的弹状病毒 PYDV 含有的脂质超过 20%（Ahmed *et al.*，1964)。LNYV 中也存在的脂质，这方面已有报道（Francki，1973)。

Selstam 和 Jackson（1983）发现 SYNV 含有约 18%的脂质，其成分包括 62%的磷脂、31%的甾酮和 7%的甘油三酸酯。对这些组分进行详细分析发现，这种病毒的脂类

成分在某些方面与感染脊椎动物的弹状病毒不同。脂质的组成符合如下观点，即病毒所获得的绝大部分的脂质来源于寄主细胞膜。Ahmed 等（1964）认为 PYDV 制剂中被寄主组分污染的脂质不超过 1/5，但还需对其进行深入的化学分析。

3. 金属

自从有关植物病毒组成的早期研究（Stanley，1936）以来，已知提纯病毒制剂的灰分中含有各种金属。病毒结合金属有以下两种类型：

第一，有些在病毒提纯过程中作为介质使用的金属离子被病毒结合。例如，Johnson（1964）发现 TYMV 中的金属含量因制备方法的不同而出现很大的差异。这类变化对于病毒的生物学活性来讲是微不足道的，但是它可影响病毒的物理特性。因此，TYMV 在 CsCl 中的有效浮力密度取决于和病毒结合的二价金属离子的数量。Durham 等（1977）指出，大多数病毒学家未注意到即使在最纯的蒸馏水中也会含有多种痕量的离子。

第二，病毒结合的离子具有重要的生物学功能。Durham 和同事发现有些病毒（如 PapMV，Durham and Bancroft，1979）在接近 pH 7.0 时以某种从蛋白质的氨基酸组成上无法预测的方式结合 H^+。Ca^{2+} 取代 H^+，表明配位的氧原子参与了结合位点。处于电负性环境的羧基可能参与 Ca^{2+} 的结合。对 PapMV 而言，每个亚基上可能有 3 个这样的结合位点。Durham 等认为，Ca^{2+} 结合对某些病毒的解体来说尤为重要（Durham *et al.*，1977）。

在不具有缓冲力的溶液中，TMV 的每个亚基结合两个 Ca^{2+}。这两个位点不完全相同而且独立地滴定（Gallagher and Lauffer，1983）。某些病毒的稳定性依赖于特定离子的存在。如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对 SBMV 的稳定性非常重要（Hsu *et al.*，1976；Hull，1977），与其相关的一种南方菜豆花叶病毒属病毒，TRoV，每个蛋白亚基上结合 1 个 Ca^{2+}（Hull，1978）。随着 SBMV 的高度精确结构的确定，Ca^{2+} 结合位点已经被确认（Abdel-Meguid *et al.*，1981）。TBSV 上的 Ca^{2+} 结合位点见图 5.34。

有些病毒如 TSV 具有一个“锌指”结合域，可特异地结合参与核酸结合的蛋白质中的锌原子。

4. 水

水对于活细胞的重要性早已得到公认，但是作为病毒组分的水及其重要性在某种程度上还未引起重视。“水合作用”（hydration）这一术语的确切含义因测定方法而异，Jaenicke 和 Lauffer（1969）曾对此问题进行过探讨。对溶液中一种病毒的各种流体动力学特性进行测定需要计算水合度。应用激光强度波动光谱可以方便准确地测定分子质量、粒子大小和病毒的溶合作用（solvation）（Harvey，1973；Camerini-Otero *et al.*，1974）。然而，溶合作用的测定即便使用现代技术也会存在较大误差。

在典型的原核细胞中，每克干物质含有 3～4 ml 水。对相关数据已知的少数具有包膜的病毒而言，含水量也处于同样的范围之内（Matthews，1975）。与此相反，小的几何体病毒的含水量要少得多（如 TBSV 为 0.75 ml/g，Camerino-Otero *et al.*，1974；TYMV 和 TSV 分别为 0.78 ml/g 和 1.1 ml/g，J. D. Harvey，个人通信，引自 Matthews，1991）。这些含量与已报道的蛋白质（如牛血清白蛋白）相似（0.6 ml/g）

(Kuntz and Kauzmann，1974)。0.6 ml/g 相当于平均每个氨基酸残基含有 3 个水分子。

CaMV 的含水量为 1.9 ml/g（Hull *et al.*，1976），比小的几何体病毒略高。呼肠病毒的含水量为 1.5 ml/g（Harvey *et al.*，1974）。可能植物呼肠病毒与 CaMV 的水合度类似。

水和病毒粒体之间可能存在几种不同的结合方式。在几何体病毒和一些具有包膜的病毒中，水与病毒的蛋白质组分结合（0.5～1.0 ml/g），这与水和分离蛋白质的结合方式相同。此外，这些具有渗透功能的双层膜的病毒含有 2～3 ml/g 的水，而且可能与细胞的保水方式相同。对病毒的外壳蛋白进行原子水平的分辨率分析发现，一些水分子结合于蛋白质内的特异性位点。

D. 讨论和总结

病毒组分及其特性和结构方面的详细信息对我们理解病毒的构造是非常重要的。例如，等轴病毒蛋白外壳的精确对称及其大小取决于外壳蛋白的特性。杆状病毒的长度取决于病毒 RNA 的长度，蛋白亚基决定了螺旋的螺距（pitch）和直径。

许多植物病毒组群的基因组由正义 ssRNA 组成，这类 RNA 在侵染细胞时可直接作为 mRNA。有意思的是，侵染各个不同界生物的病毒最普通的基因组中存在着差异（表 4.1）。与植物病毒相反，侵染细菌的主要是 dsDNA 病毒，而动物中 dsDNA 病毒和负义 ssRNA 病毒的种类相当；真菌病毒多为 dsRNA 基因组。存在这种差异的原因尚不清楚。

对基因组为正链的病毒而言，分离的 RNA 具有侵染性。然而，有些病毒 5′端共价结合的小蛋白（VPg）是侵染性所必需的。如果病毒的基因组分为 2 个或 3 个 RNA 片段，那么必须将所有组分一起接种才能进行完全的侵染。在花椰菜花叶病毒科和双生病毒科成员中，分离的 dsDNA 和 ssDNA 是有侵染性的。但是分离的弹状病毒的负义 ssRNA基因组和呼肠病毒的 dsRNA 则没有侵染性。这是因为病毒 mRNA 的合成需要病毒编码的、存在于病毒粒体中的聚合酶，第 7 章第Ⅳ节 A 将对此进行全面论述。在多数植物病毒科和属中，至少有一种病毒已完成了基因组的全序列测定。这些信息为我们认识病毒基因组的策略和复制奠定了基础。

大多数小几何体病毒的粒子含有一种外壳蛋白，这些蛋白的大小为 17～60 kDa。在早期的工作中，几种外壳蛋白的氨基酸序列是通过直接化学法测定的。然而，现在最简便的方法是由外壳蛋白基因的核苷酸序列推断出氨基酸序列。

粒体较大的植物病毒科和属（弹状病毒科、呼肠病毒科、花椰菜花叶病毒科和番茄斑萎病毒属）含有一种以上的蛋白质，其中有些是酶类，其余的为结构蛋白。两类具有包膜的植物病毒（弹状病毒和番茄斑萎病毒属病毒）含有作为脂蛋白包膜组分的脂质。这种包膜可能来源于寄主细胞的双层膜。所有病毒都含有水，带包膜的病毒比几何体病毒（不带包膜）含有更多的水。许多病毒含有二价金属离子，特别是 Ca^{2+}，有些病毒还含有多胺。这些组分对完整病毒粒体保持其稳定性可能是非常重要的。

第5章　病毒粒体的结构及装配

第Ⅰ节　导言

关于病毒粒体细微结构的知识是我们了解病毒学各个方面的先决条件。例如，病毒如何在细胞外存活、如何侵染和在细胞内复制，以及它们如何彼此相互关联等。病毒结构学的知识近年来已有大幅度增加，这都归因于更详细的化学数据和更精确的电子显微术（electron microscopy）、光学衍射（optical diffraction）、X射线晶体分析法（X-ray crystallography）的应用。

衣壳（capsid）这个术语是指一个病毒的紧凑的外壳或管状结构。（病毒）壳粒（capsomere）是指在电子显微镜照片中可见的衣壳蛋白亚基簇。病毒粒体（virion）是指一个成熟的病毒（Caspar *et al.*，1962）。对于有膜包裹的（membrane-bound）病毒，其内部的核蛋白核心称为核衣壳（nucleocapsid）。这些名词有时会引起混淆。例如，一个多组分的病毒（multicomponent virus），如AMV，它的衣壳或病毒粒体是什么样的？像TBSV这样的病毒，由相同的蛋白亚基组成二重和三重对称结构（twofold and threefold symmetry）的差异何在？哪一部分是壳粒？然而，包装（encapsulation）和衣壳化（或包壳）（encapsidation）这两个术语现在被广泛地指病毒基因组装配入病毒蛋白外壳的过程。这些术语现在有确定的含义，因而在本书中将会使用它们。同时也会用蛋白亚基（protein subunit）或结构亚基（structural subunit）表述共价连接的肽链基本结构单位。形态亚基（morphological subunit）将指由电子显微术和X射线晶体分析法所显示的蛋白亚基的聚集体。

对于病毒自装配（或自动装配）（self-assembly）的病毒结构的性质稍后将在本章中讨论。图2.1展示了已知植物病毒的大小范围（range of size）和形态。

第Ⅱ节　方法

A. 化学和生物化学研究

正如在第4章中已指出的，有关病毒大小和病毒核酸、蛋白质以及其他一些组分的本质的知识对于理解病毒的结构是至关重要的。化学和酶学的研究可提供有关病毒结构的多方面的信息。例如，羧肽酶A（carboxypeptidase A）从完整TMV切去末端苏氨酸这个事实表明TMV多肽链的C端暴露在病毒的表面（Harris and Knight，1955）。甲基甲代吡啶基（picolinimidate）与暴露的氨基基团或赖氨酸残基反应。Perham（1973）利用该试剂与多个TMV突变体反应来检测哪些赖氨酸残基位于病毒表面，哪些赖氨酸残基位于病毒内部。对于具有更复杂结构的病毒，用化学或物理方法进行部分降解。例如，去除外层包膜（outer envelope）可用于确定特定蛋白质在病毒粒体内的

定位（Jackson，1978；Lu *et al.*，1998）（参见第Ⅶ节和第Ⅷ节）。

研究某一病毒在各种 pH、离子或其他条件下的稳定性可能会得到有关病毒结构以及维持此结构的各种键（bond）的结构与性质的线索。已经进行了很多此类的研究，但结果通常很难用一种确定的方式解释（Kaper，1975）。稍后在本章中还将给出应用这种方法的一些例子。

B. 研究病毒大小的方法

1. 流体动力学测定

流体动力学测定（hydrodynamic measurement）的一个经典的程序是使用 Svedberg 方程（Schachman，1959）。

$$M=\frac{RTs}{D\ (1-v^{*}\rho)}$$

式中，R 是摩尔气体常数［8.134 J/（mole・K)］；T 是以 Kelvin 氏温度表示的绝对温度（absolute temperature in degrees Kelvin）；s 是沉降系数（sedimentation coefficient）；D 是扩散系数（diffusion coefficient）；v^{*} 为所研究病毒的部分比体积（partial specific volume）。用经典的方法测定 D 和 v^{*} 相当困难。s 可以用分析超速离心机（analytical ultracentrifuge）很容易地测定。由于这个原因，很多工作者对于一个新病毒只测定其 s。分子质量（molecular weight）这个术语被广泛地用于描述病毒。本书将依照这种用法，但粒子重量（particle weight）应该是一个更严谨、更准确的术语。

通过制备超速离心机（preparative ultracentrifuge）分析病毒与已知 s 的标准物在线性蔗糖密度梯度（linear sucrose density gradient）中的沉降距离间的比较，可以方便地测量 s。标准物（marker）必须与未知 s 的待测物有相似的沉降速率（sedimentation rate）。否则，可以使用其他的计算方法（Clark，1976）。

激光散射（laser light scattering）已经用来以高精密的程度测定一些近似球形病毒的半径（Harvey，1973；Camerino-Otero *et al.*，1974）。这种方法相当有意思，因为它能估算出含水的病毒粒体的直径，而 Svedberg 方程和电镜只能确定脱水的（dehydrated）病毒粒体的直径。将这两种方法相比较可以测定病毒粒体的水合作用（hydration）。

2. 电子显微术

通过分离的病毒粒体或受侵染细胞超薄切片的电子显微照片（electron micrograph）的测量，可以很方便地估算病毒的大小。对于一些大的病毒和杆状病毒来说，这些测定方法可能最为有效，但是它们易出现一些显著的误差。通过电子显微照片测定病毒的尺寸存在多种固有的放大误差（magnification error）。使用一种粒子特征明确、稳定、与众不同的病毒，如 TMV，作为测定的内在参照物的测定方法可以在一定程度上而不是完全地克服上述不足（Bos，1975）。然而 Markham 等（1964）指出，TMV 杆状粒子在长度上可能并不绝对一致。其杆状粒子的宽度也许能提供更好的参照标准。病毒粒体在支持膜上的扁化（flattening）可能会引起显著的误差。扁化可通过倾斜台

(tilting stage) 检测出来 (Serwer, 1977)。如果不使用喷碳的支持膜，则由于膜的拉伸可能造成单个病毒粒体的显著变形 (Ronald *et al.*, 1977)。

当分析杆状病毒的长度分布 (length distribution) 时，有必要结合多次测定的个体数值依大小进行归类。如果选择的划分尺度过大，多于一种长度的病毒粒体存在的情形有可能被忽视。而测量弯曲的杆体 (flexuous rod) 病毒的大小存在更多的困难 (De Leeuw, 1975)。

Hatta (1976) 指出，在纯化的小等轴病毒的晶体的超薄切片观察到的病毒粒体陈列 (array) 间的距离总是比实际的粒子直径小，因为排列时粒子间存在重叠。

3. X 射线晶体分析法

对于可以获得稳定晶体制剂（制备物）(crystalline preparation) 的病毒来说，通过 X 射线晶体分析法可以得出处于晶体状态粒子半径的准确估计。这一技术仅限于那些稳定的病毒或在盐溶液中稳定从而能获得晶体 (crystal) 的病毒。

4. 中子小角度散射法

中子小角度散射法 (neutron small-scale scattering)（参见第Ⅱ节 E）可以准确地估算在相对低盐浓度溶液中的二十面体病毒的半径。这一方法已确定，在稳定的条件下，像 BMV 这类的小二十面体病毒粒体在溶液中其大小可能存在差异 (Chauvin *et al.*, 1978)。

5. 原子力显微术

当 TMV 粒子在玻璃基质上干燥时，会以一种特有的方式聚集，因而可通过原子力显微术 (atomic force microscopy) 来研究 (Maeda, 1997)。在一个高度定向的区域 (highly orientated region)，测量粒子的长度为 301 nm、宽度为 14 .7 nm；后来的测量结果显示发生了拥挤的病毒粒体的重叠 (intercalation of packed particle)。这些粒子没有被扁化 (flattened)，其厚度 (depth) 为 16.8～18.6 nm。

C. 精细结构的测定：电子显微术

Horne (1985) 和 Milne (1993) 将电子显微术的应用引入到植物病毒结构的研究中。

1. 金属投影的制备物

在病毒粒体的早期电子显微镜研究中，用重金属遮蔽投影法 (shadowing with heavy metal) 来增加对比度 (contrast)。这种遮蔽投影趋向于使表面细微结构模糊化，但可给出干的病毒粒体 (dry particle) 总体的大小和形态信息。如果样品经冷冻干燥后在高度真空条件下投影，则会得到更多的信息 (Hatta and Francki, 1977)。例如，Roberts (1988) 用这种方法得到了 TRSV 具有类似于由 60 个亚基以 $T=1$ 的五聚体排列组成模型的结构。

2. 冷冻蚀刻

冷冻蚀刻 (freeze etching) 技术可以提供较多的有关病毒特别是有脂蛋白双层膜的

病毒的表面和亚结构的有用信息。尽管 Steere (1969) 展示了受侵染细胞内经冷冻断裂(freeze-fracture) 处理的 PYDV 粒子的排列图，但是，使用这种方法至今还未能获得关于植物病毒的新的结构信息。

3. 负染法 (negative staining)

在揭示病毒粒体的微细形态方面，电子致密的染料 (electron-dense stain) 已被证明比金属遮蔽投影法更有用。这样的染料可分为正染料 (positive stain) 和负染料。正染料直接与病毒发生化学反应并结合到病毒上 [例如，在适当的条件下使用各种锇 (osmium)、铅 (lead)、双氧铀化合物 (uranyl compound) 以及磷钨酸 (phosphotungstic acid, PTA)]。化合物可能导致病毒结构的改变或瓦解。与此相反，在负染法中电子致密的金属并不与病毒反应，而是渗入病毒表面或内部的空间。这是当今通过电镜分析病毒结构的首选技术。普通的负染料是在 pH 7.0 的磷钨酸钾 (potassium phosphotungstate, KPT) 和在接近 pH 5.0 条件下使用的醋酸双氧铀 (uranyl acetate) 或甲酸盐 (formate)。与周围电子致密的金属材 (染) 料背景相对比，病毒的结构被凸显出来。用于支持染色样品的碳基质具有小颗粒状的背景。在载网 (grid) 各网孔喷碳薄膜上负染的病毒粒体图像中，通常可以非常清晰地看到病毒的微细结构。染色剂不一定渗入病毒粒体内的任何空隙中去。有关负染的技术进展请参见 Harris 和 Horne (1994) 的文章。

对于螺旋对称的杆状病毒，粒体内的中空 (central hollow) 常能通过染色而显示出来。由于小型球状病毒通常伴随着空的蛋白衣壳，一些学者认为被染色的、内部存在一个致密区域的粒子为提纯制剂中的空蛋白壳。然而，染色条件可能导致一部分完整病毒粒体的 RNA 丢失而使染料渗入粒子，染料也可能不进入某些空壳内。不同染色对某一病毒的形态的破坏或改变以及改变的程度存在差异，主要取决于染色所使用的条件。依靠蛋白质-RNA 之间的键 (bond) 来维持其粒子稳定性的很多病毒在 pH>7.0 时，磷钨酸钾 (KPT) 可使其裂解。

即使最好的电子显微照片，病毒粒体的细致结构亦趋向于模糊，这首先是由于实际病毒粒体结构的细小不规则性，以及其他因素 (如染料的不均匀) 所造成的；其次，染料在病毒周围染色的程度不同造成的反差也影响电镜观察的效果。为了克服这些困难以及从负染的单个病毒粒体影像中获得更加可信和详细的数据，已经使用了多种方法。

主要的方法有重叠摄影 (photographic superposition) (Markham *et al.*, 1963, 1964; Finch and Holmes, 1967)、X 射线影像图 (shadowgraph) (Finch and Klug, 1966, 1967) 和光学变换 (optical transform) (Klug and Berger, 1964; Crowther and Klug, 1975; Steven *et al.*, 1981)。Vogel 和 Provencher (1988) 建立了一种对单个病毒粒体无序集合 (disordered collection) 的投影 (projection) 进行三维重建 (reconstruction) 的计算方法，并将这一方法应用于对 TBSV 的分析。光学衍射法已被应用于在电子显微镜 (electron microscope) 下观察等轴病毒的体外结晶体阵列 (crystalline array) (Horne and Pasquali-Ronchetti, 1974; Horne *et al.*, 1977) (图 5.1)。随着近来 X 射线晶体分析法在病毒结构研究中应用的进展，除了那些不能应用 X 射线分析的病毒外，上述的这些技术可能不会再被广泛地应用。

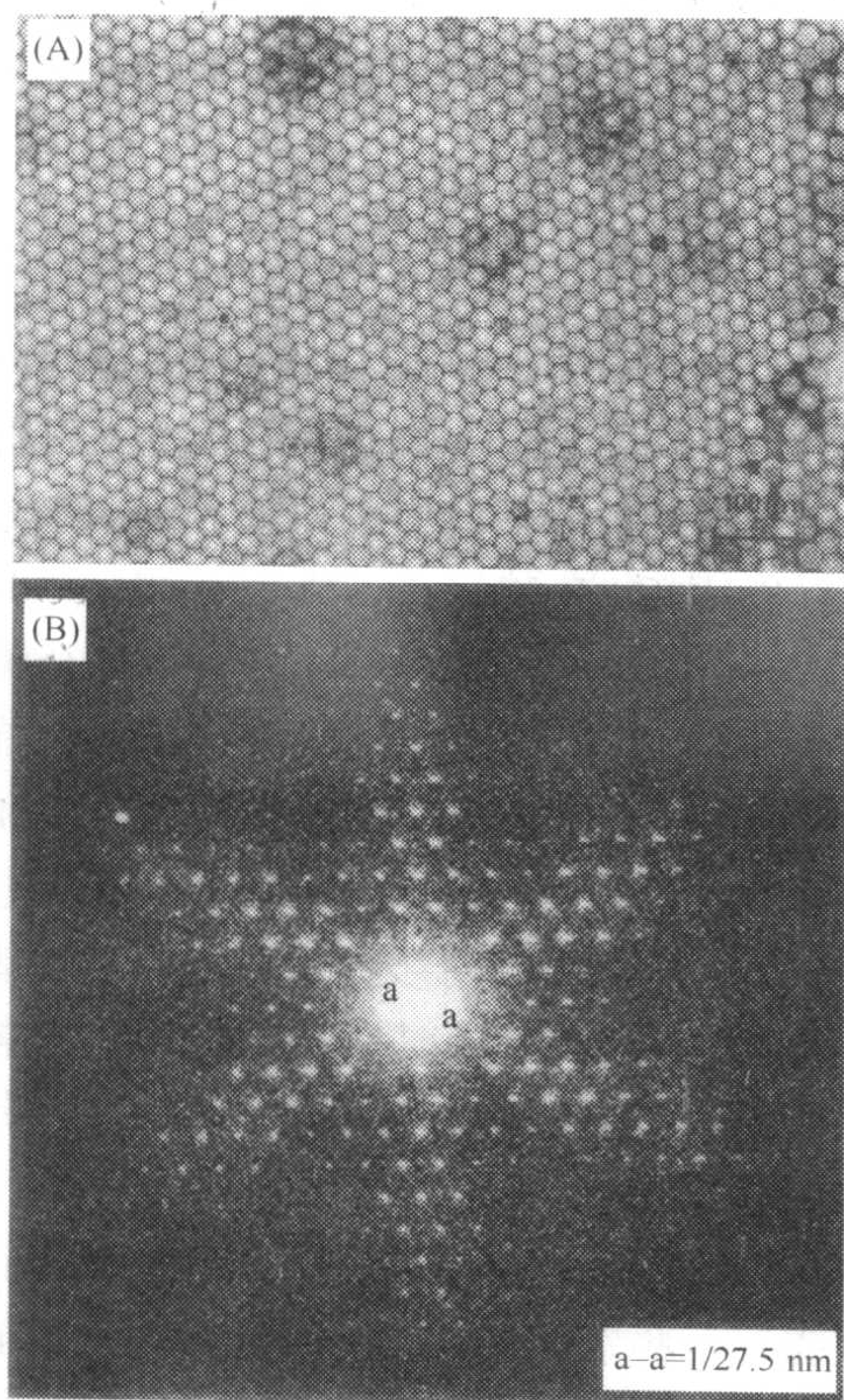


图 5.1 (A) 芜菁丛簇病毒 (TRoV) 的二维六边形阵列的局部，显示了病毒粒体在晶格 (lattice) 内的有序排列。可以清楚地看到单个衣壳的浅色中心区域以及少数病毒粒体的内部已被染料完全渗透。从这个方向上看，呈六边形阵列的衣壳的形状与尺寸比所观察到的呈四边形和不规则阵列 (skewed array) 的衣壳更有规则。 (B) 从材料 (A) 中获得的光学衍射图式显示在 TRoV 的六边形阵列存在典型的光谱。第一级点 (first order spot) a-a 对应于病毒粒体间的中心间距 (27.5 nm)。经允许，引自 Horne 等 (1977)。

4. 超薄切片

一些有包膜病毒 (enveloped virus) 的某些结构 (特别是双层膜) 的一些方面的内容可以用受侵染的细胞或含有病毒的沉淀 (pellet) 的超薄切片进行研究 (图 5.41)。

5. 冷冻电子显微术

冷冻电子显微术 (cryoelectron microscopy) 使用在含水介质中极迅速冷冻的样品，使对称粒子在无染色剂存在和保存样品对称的条件下成像。Jeng 等 (1989) 使用 TMV 作为测试的目的物建立了用于测定螺旋对称的病毒细致结构的程序。从在透明冰中冷冻的水合 TMV 粒子的电子影像获得了间距优于 10 Å 的 TMV 结构数据。这一技术已被广泛地应用于等轴病毒的研究中。对于这类病毒使用一系列的方法可将二维的影像重建为三维影像，如 Fuller 等 (1996)、Lanczycki 等 (1998) 及 Rossman 和 Tao (1999) 的工作。这一技术得到的信息补充了 X 射线晶体分析法，更适用于分析不能获得晶体的病毒的细致结构。例如，通过冷冻电子显微术对 CaMV 的结构以 30 Å 的分辨率 (resolution) 进行解析 (Cheng *et al.*, 1992)。

6. 冷冻电子显微术与负染法的比较

有关冷冻电子显微术与负染法相比的优缺点的讨论很多。讨论的基本点如下：

(1) 未染色的生物材料反差低会导致聚焦和信噪比 (signal to noise ratio) 不佳的问题。

(2) 处于完全水合状态的标本对电子束很敏感。

(3) 冷冻电子显微术相当复杂且成本高。

(4) 结合图像分析的冷冻电子显微术的分辨率通常比负染法高很多。

Adrian 等 (1998) 建立了一种称为“冰冻-负染”(cryo-negative staining) 的技术，可以综合两种技术的优点。通过钼酸铵 (ammonium molybdate) 制备玻璃化的样品 (vitrified sample)，并转到有孔的碳支持膜上。

D. X 射线晶体分析法

在 X 射线晶体分析法可以应用的各个方面，均为获得在三维空间有规则排列的结

构提供了最有力的手段。Finch 和 Holmes（1967）对涉及的这类方法做了介绍。

在过去的 20 多年中，将 X 射线晶体分析应用于更多的病毒以及利用更高的分辨率（resolution）方面已有了显著的进步。随着结构达到了原子水平的解析（清晰）度（definition），阐明细微结构与生物功能的关系成为可能。其中主要的进展如下：

（1）计算机的容量与速度方面的提高导致了成本的降低。

（2）非晶体学的对称求均值法（symmetry averaging）的引入。二十面体病毒如 TBSV 和 STNV，其病毒粒体为 60 折的对称结构（60-fold symmetry）。这种与用于分析的晶体的对称（symmetry of the crystal）一致性的程度取决于偶然获得的晶体的形式（crystal form）。如 TBSV，最小的晶体重复单位（即非对称单位）由外壳蛋白的 5 个三聚体构成。这与晶体对称正好相关。因此，该病毒的对称求均值（symmetry averaging）出现在选择的五重对称轴周围。从一个初始的电子密度图（initial electron density map）的连续重新计算去除噪声背景并增强图的细节。Olson 等（1983）给出了关于将该程序应用于 TBSV 的一个例子。

（3）计算机制图（computer graphics）技术已经取代了过去费力的手工建模（model building），这对于细化一个结构是必需的（Olson *et al.*，1985）。通过颜色编码（color coding）和细节的选择性省略（selective omission of detail）等手段，计算机制图对于探索一个三维结构的特定部位和以一种更易于理解的形式交流关于结构的想法都极其有用（Namba *et al.*，1984，1988）。

（4）定点诱变法（site-directed mutagenesis）已应用于蛋白质晶体分析中。在一个蛋白质的任意选定位点将一个氨基酸替换为另一个氨基酸的可行性使晶体学从一种被动的技术变成以系统化和合理的方式研究结构与功能的关系的手段。

X 射线晶体学分析对于病毒结构分析主要有两个方面的局限性：

（1）几乎对所有的二十面体病毒来说，多数核酸与其对称的蛋白外壳相比不是以一种有规则的方式排列。然而，对一些等轴病毒而言，可以得到其粒子内核酸分布的信息（参见第Ⅵ节 C）。

（2）较大的病毒如弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）的成员不能晶体化。此外，其结构的很多特征并没有严格的规律性。对于这些病毒，电子显微术可提供最佳的信息。

E. 中子小角度散射

病毒溶液的中子小角度散射是获取小型等轴病毒结构特别是 RNA 或 DNA 和蛋白外壳的径向维度（radial dimension）的低分辨率信息的一种方法，溶液内的不同条件对病毒尺寸（维度）的影响很容易确定。该方法利用在散射场中 H_2O 与 D_2O 的混合物可以用来与 RNA 或蛋白质相匹配的优点，在小角度下的中子散射分析可为建立模型提供一系列的数据。

F. 质谱分析法

质谱分析法（mass spectrometry）不仅可测定病毒蛋白质和粒体的质量，还可以用于鉴定病毒蛋白质的翻译后修饰，如肉豆蔻酰基化（myristoylation）、磷酸化、二硫键桥（disulfide bridging）（Siuzdak，1998）。这项技术与 X 射线晶体学分析相结合可以

研究外壳蛋白的淌度（流动性）(mobility)。类似地，核磁共振光谱测定法（nuclear-magnetic-resonance spectroscopy）可以检测病毒粒体表面的可移动因子（Brierley *et al.*，1993）。

G. 血清学方法

特异的抗体与完整的病毒或解离的病毒外壳蛋白的反应已被用来获取与病毒结构相关的信息。例如，长线病毒属病毒（closteroviruses）和毛病毒属病毒（criniviruses）的弯曲杆状粒体上次要外壳蛋白的末端已用多克隆抗体定位识别（图 5.12）。

单克隆抗体（MAb）被证明对这类研究特别有用，尽管它有明显的局限性（Kekuda *et al.*，1995）。其他应用单克隆抗体的例子有用单克隆抗体确定 PMTV（Pereira *et al.*，1994）和 PVA（Moravec *et al.*，1998）的抗原结构。诱发单克隆抗体的表位（抗原决定簇）(epitope）类型的描述见第 15 章第Ⅳ节 A.2。

任意一个抗原决定簇（antigenic determinant）的构象可能由于蛋白质上其他位点的氨基酸的替换而改变，这使人们对有关密切相关的蛋白质之间交叉反应结果的结构方面的解释产生困惑。此外，正如在一系列 TMV 的突变体中所发现的一样（Al-Moudallal *et al.*，1982)，不同的单克隆抗体检测氨基酸残基替换的能力可能极其不同。尽管如此，血清学技术提供了一些病毒特别是对于那些还没有通过 X 射线晶体分析所确定的蛋白质细致结构的病毒的结构信息。例如，使用一系列的单克隆抗体测定法在 PVX 的外壳蛋白上可以分辨出至少 3 种不同的抗原决定簇（Koenig and Torrance，1986）。结果总结见图 5.2。N 端的表面定位是由 Söber 等（1988）确认的。

TYMV 外壳蛋白的 N 端和 C 端区域被认为位于病毒粒体的表面（Quesniaux *et al.*，1983a，b）。同样地，免疫学证据确认了马铃薯 Y 病毒属病毒（potyviruses）的外壳蛋白的 N 端区域也位于病毒表面（Shukla *et al.*，1988b）。看来其他杆状病毒的 N 端和 C 端都具有位于粒体表面的共同特征。

当将整个病毒作为抗原时，用病毒结构术语解释 ELISA 检测结果必须十分谨慎，正如以下的结果所显示的。在 ELISA 测定中，用一个相应于 TBSV 部分可活动的氨基末端臂（28～40 个氨基酸）的合成多肽产生的抗体与以整个病毒作为抗原进行反应（Jaegle *et al.*，1988）。由于病毒的氨基末端臂位于非常紧密的外壳内部（参见第Ⅵ节 B.6.d)，该结果意味着在酶联板上病毒的结构必须充分打开使得抗体能与通常隐藏的臂反应。对 SBMV 的测定也得到了类似的结果（MacKenzie and Tremaine，1986)。

正如 Dore 等（1987b）所指出的，抗原位点（antigenic site）的确定性定位（delineation）需要病毒多肽三维结构的知识。在很多情况下，如果已经了解了病毒的三维结构，则为何还要确定与其结构相关的植物病毒的抗原位点？植物病毒的情况与脊椎动物病毒的情况有很大的不同，有关后者的抗原位点存在的知识可能对疫苗的开发很重要。当然，随着 DNA 重组技术的发展，对植物病毒表面结构的了解可能有助于鉴定出一些位点，在这些位点上可以引入外源的表位（抗原决定簇），而得到的重组病毒可以用于免疫接种（vaccination）(参见第 16 章第Ⅸ节 C)。

Dore 等（1988）建立了一种涉及在电子显微镜载网上的 ELISA 反应和金标记的抗

抗原决定簇与各 MAb 组的反应	抗原决定簇在未受干扰的（a）和部分变性的（b）亚基上的示意图	抗原决定簇的特性
I	(a) (b)	这些决定簇在突出的 N 端的外边，并可被完全变性所破坏；它们在部分变性的制备物内被含有突出的 N 端遮盖
Ⅱ	(a) (b)	此类抗原决定簇位于突出的 N 端上；当用粗汁液中胰蛋白酶或蛋白酶处理病毒时，它们丢失；它们在部分变性制剂内变得不易接近或被破坏
Ⅲ	(a) (b)	这些决定簇处于突出的 N 端之外，并只在病毒粒体部分变性后的 B、CsAg 和 M 株系暴露出来。它们用 SDS 等充分变性并不被破坏

图 5.2 通过与一系列单克隆抗体的不同反应（differential reactivity）在马铃薯 X 病毒（PVX）外壳蛋白上鉴别出的 3 种抗原决定簇的示意图。经允许，引自 Koenig 和 Torrance（1986）。

体（gold-labeled antibody）的理想程序。他们使用这一程序的结果显示，能与病毒粒体和外壳蛋白亚基反应的 TMV 单克隆抗体仅在杆状粒子的一端结合（图 5.3）。进一步研究表明，这一单克隆抗体与含有左径向和右径向的 α 螺旋结构的蛋白亚基的表面结合（Dore *et al.*，1989）。这一结果以图示的方式证实了采用 X 射线晶体分析法已确认的一个事实，即 TMV 的杆状粒子的外壳蛋白的上表面与下表面呈现不同的化学性质。

Lesemann 等（1990）使用相似的技术分辨出 3 组与 BNYVV 反应的单克隆抗体。其中一个与粒子的全长都反应，其他两个分别与粒子两端的抗原位点反应。

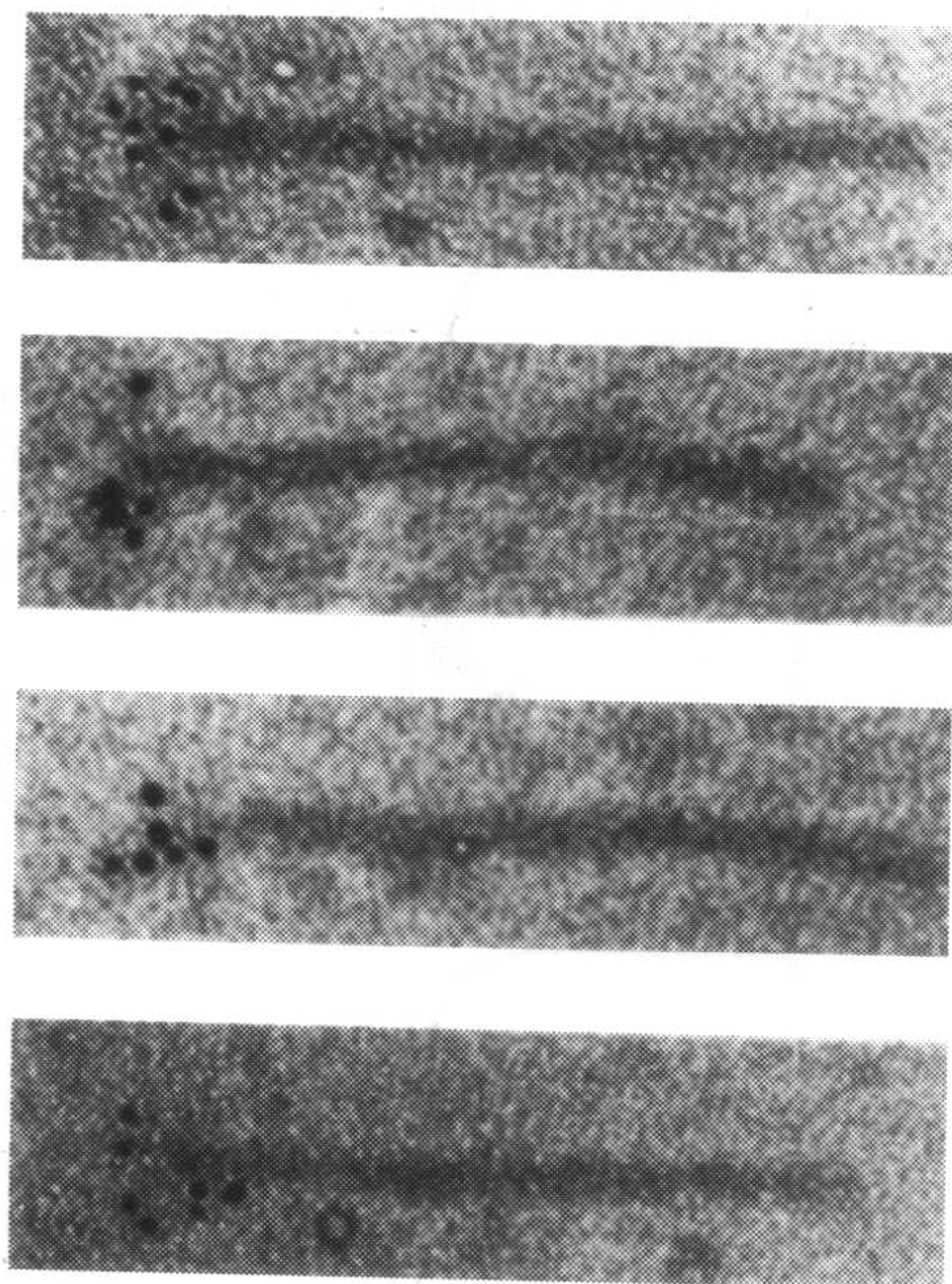


图 5.3　电子显微照片显示金标记的单克隆抗体与 TMV 杆状粒子的一个末端结合。标尺＝100 nm。承蒙惠允，引自 Dore 等（1988）。

H. 研究维持稳定性键的方法

病毒外壳蛋白和核酸的一级结构都依靠共价键。在具有简单几何结构的病毒的最终结构中，蛋白质与核酸这两大组分通过多种非共价键以一种精确的方式组合在一起。其中涉及 3 种相互作用：蛋白质-蛋白质、蛋白质-RNA、RNA-RNA。此外，小分子物质如二价的金属离子（特别是 Ca^{2+}）可能在一些病毒的稳定性上有显著的作用。这些互作的知识对于理解病毒在不同环境下的稳定性、在病毒合成时粒子是如何装配的，以及在侵染细胞后核酸如何释放等方面是十分重要的。稳定化互作是疏水键（hydrophobic bond）、氢键、盐桥键（salt linkage）以及其他一些长距离和短距离的互作。已应用了各种各样的物理和化学方法以便增进我们对病毒结构中这些键的作用的理解。

1. X 射线晶体学分析

通过 X 射线晶体学分析及对外壳蛋白一级结构的认识，构建分辨率小于 3 Å 的模型有助于对蛋白亚基二级结构和三级结构内各种键的细致理解。此外，也可以详细地解析组成病毒四级结构（quaternary structure）的亚基间的各键、附属的分子和离子，主要是水和 Ca^{2+} 的作用。在原子分辨率下研究一个病毒的结构可提供大量详细的信息，这些内容因篇幅所限不能包括在本书内。一些这类结构的精彩部分将在下面各节中讨论。

2. 维持稳定性的化学和物理因子

pH、离子强度、离子的种类、温度、化合物（如苯酚和去污剂）、氢键断裂剂（如尿素）对病毒稳定性的影响已在很多实验室进行了研究（Kaper，1975）。这类实验只能为我们提供关于维持病毒稳定所涉及的各种键的概括性信息。

在小的等轴病毒中，粒子的稳定性范围很宽。具有很强的蛋白质-蛋白质互作的病毒如TYMV是最稳定的。而这一稳定性范围内的另一端以CMV和AMV为代表，其中以蛋白质-RNA互作占优势（Kaper，1975）。

很明显，蛋白质-蛋白质互作对TYMV的稳定性是十分重要的，因为空的蛋白质外壳是十分稳定的。亚基间的疏水键是其稳定性的重要因素，因为：① TYMV在高离子强度下很稳定；②用苯酚与乙醇很容易使其降解；③通过尿素、有机汞化合物（organic mercurial compound）及其他化学试剂使病毒和空的蛋白质外壳降解这一现象可以用主要的蛋白质与蛋白质互作是基于疏水作用加以解释（Kaper，1975）。极端的条件如高pH（Keeling and Matthews，1982）、冷冻和熔化（Katouzian-Safadi and Haenni，1986）已被用于研究RNA从TYMV粒子中的释放。

已用碱性条件证明蛋白亚基从TMV杆状粒子上的脱落是由5′端开始的，并揭示了脱壳过程中的中间产物。这些结构归因于蛋白质与RNA之间存在着异常强烈的相互作用的区域（Perham and Wilson，1978）。

3. 外壳蛋白的化学修饰

外壳蛋白上的特殊氨基酸残基可通过加一个侧链而被修饰，这种取代对病毒稳定性的作用可被检测出来（如TMV，Wilson and Perham，1985）。

4. 离子的去除

因为等轴病毒粒体部分依靠Ca^{2+}使其结构稳定，使用EDTA或EGTA去除这些离子通常可导致粒子的膨胀。研究这种膨胀现象可以得到有关维持其稳定性的重要键的种类方面的信息。各种监测这种膨胀现象的技术已被应用。例如，Krüse等（1982）使用小角度X射线、中子散射、离心分析和荧光技术来研究TBSV的膨胀。在有EDTA存在的条件下，STNV的膨胀通过使用超速离心、X射线晶体学技术得以证明（Unge *et al.*，1986）。通常隐藏在粒子结构内部的氨基末端多肽在已膨胀的病毒中变得对胰蛋白酶敏感。SBMV膨胀的动力学已应用光子相关光谱学技术（photon correlation spectroscopy）进行了研究（Brisco *et al.*，1986b）。

5. 圆二色性

圆二色性光谱（circular dichroism spectra）可被用于估计病毒蛋白亚基的α螺旋和β结构的程度（Denloye *et al.*，1978对TRoV的研究；Odumosu *et al.*，1981对SBMV的研究）。

6. 适用于研究病毒粒体内部核酸的方法

几种方法可用来有效地估计病毒内部的核酸以双螺旋配对或以其他方式排列的程

度。这些方法包括在 260 nm 的相对吸收值（Haselkorn，1962 对 TYMV 的研究）、拉曼激光光谱学分析（laser Raman spectroscopy）（Hartman *et al.*，1978 对 TYMV 的研究）、圆二色性光谱（Odumosu *et al.*，1981 对 SBMV 的研究）和磁性双折射（magnetic birefringence）（Torbet *et al.*，1986 对 CaMV 的研究）。

第Ⅲ节 杆状病毒的结构

A. 导言

Crick 和 Watson（1956）提出了一个关于小型病毒结构的假说，这一假说后来已被证实。利用有关 TYMV 和 TMV 的知识，即病毒 RNA 包裹在病毒蛋白外壳内和裸露的 RNA 具有侵染性（在当时仅知 TMV），他们设想，一种小病毒的基本结构要求是提供一个保护自己核糖核酸的蛋白外壳。他们认为在细胞内由病毒控制产生的相当大的蛋白外壳可能由大量相同的小蛋白质分子组成才是最有效的，而不是由一个或几个很大的蛋白质组成。

他们指出，如果在粒子中重复使用相同的键进行排列，则小蛋白分子将会以有序的方式在 RNA 周围聚集。亚基的排列只存在有限的几种方式。所有病毒的几何学结构都是基于杆状粒子的原则或球状粒子的原则。

杆状病毒的蛋白亚基以螺旋方式排列。以螺旋排列方式包装到杆状病毒内的蛋白亚基的数目并没有理论上的限制。

B. 烟草花叶病毒属（*Tobamovirus*）

1. 一般特征

TMV 粒子为僵直的螺旋杆状，长 300 nm，直径为 18 nm。粒子的组成中蛋白质约占 95%，RNA 约占 5%。其结构非常稳定，据报道，未灭菌的（non-sterile）病毒提取物在室温下至少可保持侵染活性达 50 年（Silber and Burk，1965）。而 TMV 裸露的 RNA 的稳定性并不比其他任何单链 RNA 强。因此，与侵染性相关的病毒稳定性是相邻的蛋白亚基间以及蛋白质-RNA 间互作的结果。

X 射线衍射分析为我们提供了一幅有关其杆状粒子内蛋白亚基和 RNA 排列的详细图像。该病毒粒体由大约 2130 个亚基以螺旋方式紧密地排列组成。其螺距（pitch）为 2.3 nm，其 RNA 链在螺旋排列的蛋白亚基内部紧密地排列成一个螺旋状（图 5.4）。

每个蛋白亚基都有 RNA 的 3 个核苷酸与其相连，每一圈螺旋有 49 个核苷酸和 $16\frac{1}{3}$ 个蛋白亚基。其 RNA 上的磷酸基团距杆状粒子的螺旋轴心约 4 nm。通过在电子束下倾斜负染的 TMV 粒子并注意其边缘外观的变化，Finch（1972）确定了 TMV 的基本螺旋是右手的（right-handed）。在一定比例的负染粒子中，可观察到杆状粒子的一端凹陷，而另一端凸起。RNA 的 3′端位于凸的一端，5′ 端位于凹的一端（Wilson *et al.*，1976；Butler *et al.*，1977）。负染的病毒粒体在半径约 2 nm 的中心孔洞内充满了染料（图 5.5）。

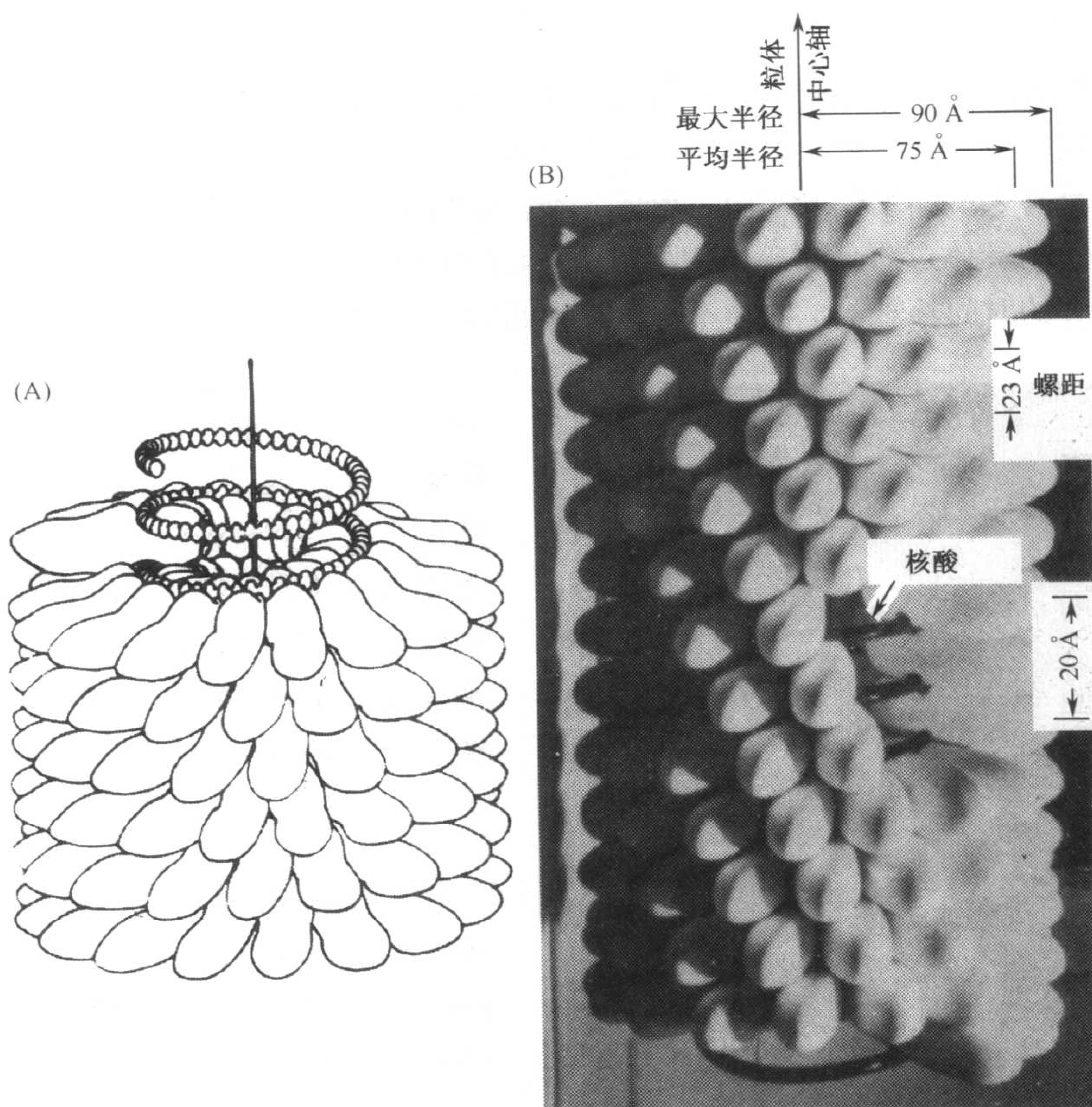


图 5.4　TMV 的结构。(A) RNA 与蛋白亚基关系的示意图。图中所示的未包裹蛋白质的 RNA 在没有蛋白亚基存在时不能保持这种构型。每个蛋白亚基对应于 3 个核苷酸，或者说主螺旋的每一圈有 49 个核苷酸，其空间相距约 5 Å。(B) TMV 的模型照片，显示主要空间尺寸数据。重复的单元结构沿轴向每 69 Å 重复一次，每个重复单元含有分布于三圈螺旋上的 49 个蛋白亚基。经允许，引自 Klug 和 Caspar (1960)，并且主要基于 R. E. Franklin 的工作。

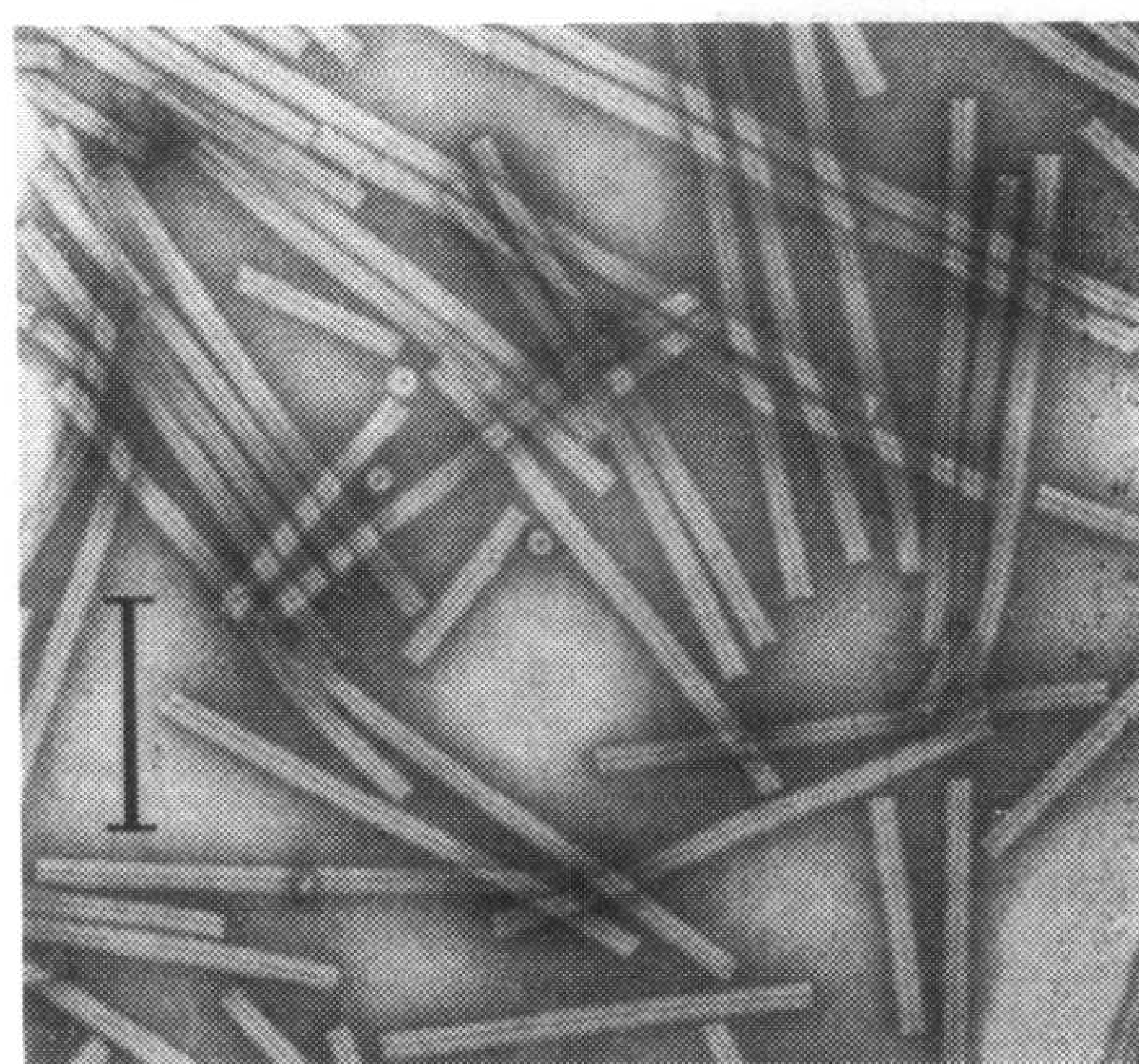


图 5.5　TMV 的负染电子显微照片。可以很清楚地看到粒子轴的中心孔内充满了染料。还可看到几个显示中心孔的蛋白质圆盘。标尺＝100 nm。承蒙 R. W. Horne 提供照片。

2. 短杆状粒子

在提纯的 TMV 制剂中含有一定比例的、长度明显短于 300 nm 的杆状粒子。由于聚集的问题，研究这些短杆状粒子可能很困难。在适当的条件下，完整的病毒粒体和较短的粒子都有末端相聚积的倾向，形成各种长度的粒子。所观察到的长度分布主要依赖于病毒制备的具体过程。影响长度分布的因素有 pH、离子强度、离子的本质特性、温度、储存的时间长短等，但并不是所有涉及的因子都已被充分地研究。

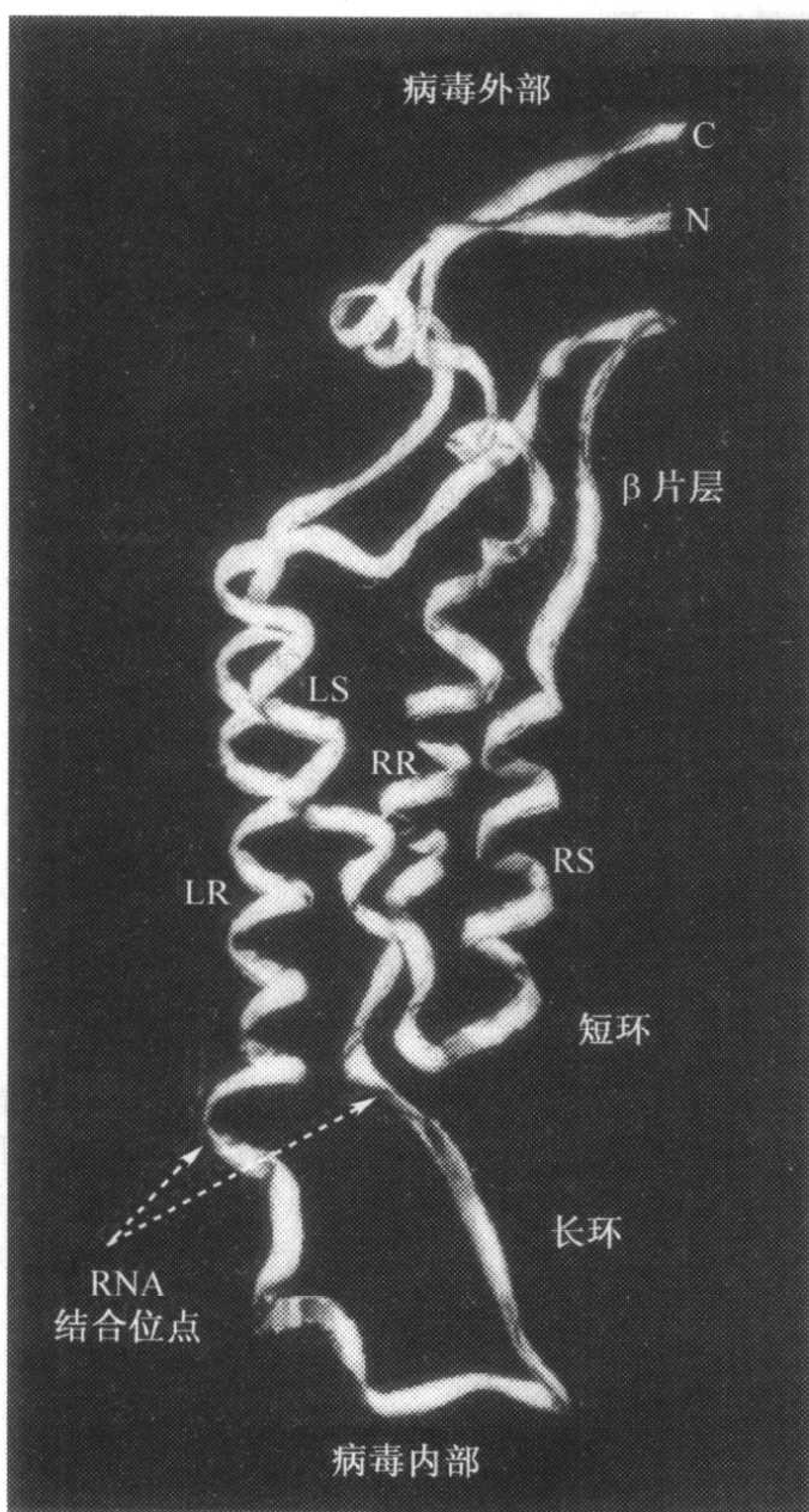


图 5.6　TMV 外壳蛋白 α 碳示踪（α-carbon tracing）的带状示意图。蛋白质的核心是一个由 4 个 α 螺旋［左回转螺旋（left-slewed，LS）、左径向螺旋（left-radial，LR）、右回转螺旋（RS）与右径向螺旋（RR）］组成的右手螺旋束。长环连接 LR 和 RR 螺旋。承蒙版权所有者（The American Phytopathological Society）的惠允，引自 Taraporewala 和 Culver（1997）。

很多较短的杆状粒子可能没有特殊的意义，它们可能是在分离时仅部分装配的病毒粒体，或是在分离过程中断裂而成。然而，在受 SHWV 侵染的菜豆中，含有外壳蛋白基因（约 1 kb）的 RNA 在复制中作为一种分离的（discrete）RNA 分子被合成，并被装配成大约 40 nm 长的杆状粒子（Higgins *et al.*，1976）。

3. 外壳蛋白的特点

外壳蛋白由 158 个氨基酸组成，分子质量为 17～18 kDa。纤维衍射（fiber diffraction）研究在 2.9 Å 的分辨率确定了其结构（Namba *et al.*，1989）（图 5.6）。

该蛋白质有高比例的二级结构，其中 50%的残基形成 α 螺旋，10%的残基形成 β 结构。此外，还存在很多回折（reverse-turn）。4 个紧密平行的或反相平行的 α 螺旋（残基 20～32、38～48、74～88 和 114～134）组成亚基的核心，4 个螺旋的远端由一个窄的弯曲的 β 片层（β-sheet）横向相连。远离 β 片层的亚基的中心部分存在一个芳香族残基簇（cluster of aromatic residues）（Phe12、Trp17、Phe62、Tyr70、Tyr139 和 Phe144），形成一个疏水区。蛋白质的 N 端和 C 端露在粒子外。该多肽链在粒子的 4 nm 半径以内处于一种易曲或无序的状态，所以这一区域的结构尚未被揭示。

4. 双盘结构

TMV 外壳蛋白亚基重装配的产物之一是一种双盘（double disk）结构，它含有两个各由 17 个蛋白亚基组成的环。该结构十分有趣，因为可以测定其内部的亚基接触的细节。在适当的条件下这种盘形成真正的三维晶体。虽然重复单位很大，但可以应用 X

射线晶体学分析法。Klug 及其同事采用这一方法经过 12 年的研究以 2.8 Å 的分辨率解析了蛋白亚基和双盘的结构（Bloomer *et al.*，1978）。

盘内上部环的亚基的截面看起来是扁平的。下部环的亚基倾斜向下朝向盘的中央（图 5.7）。在亚基之间有 3 个垂直相连的区域，其细节如图 5.7。

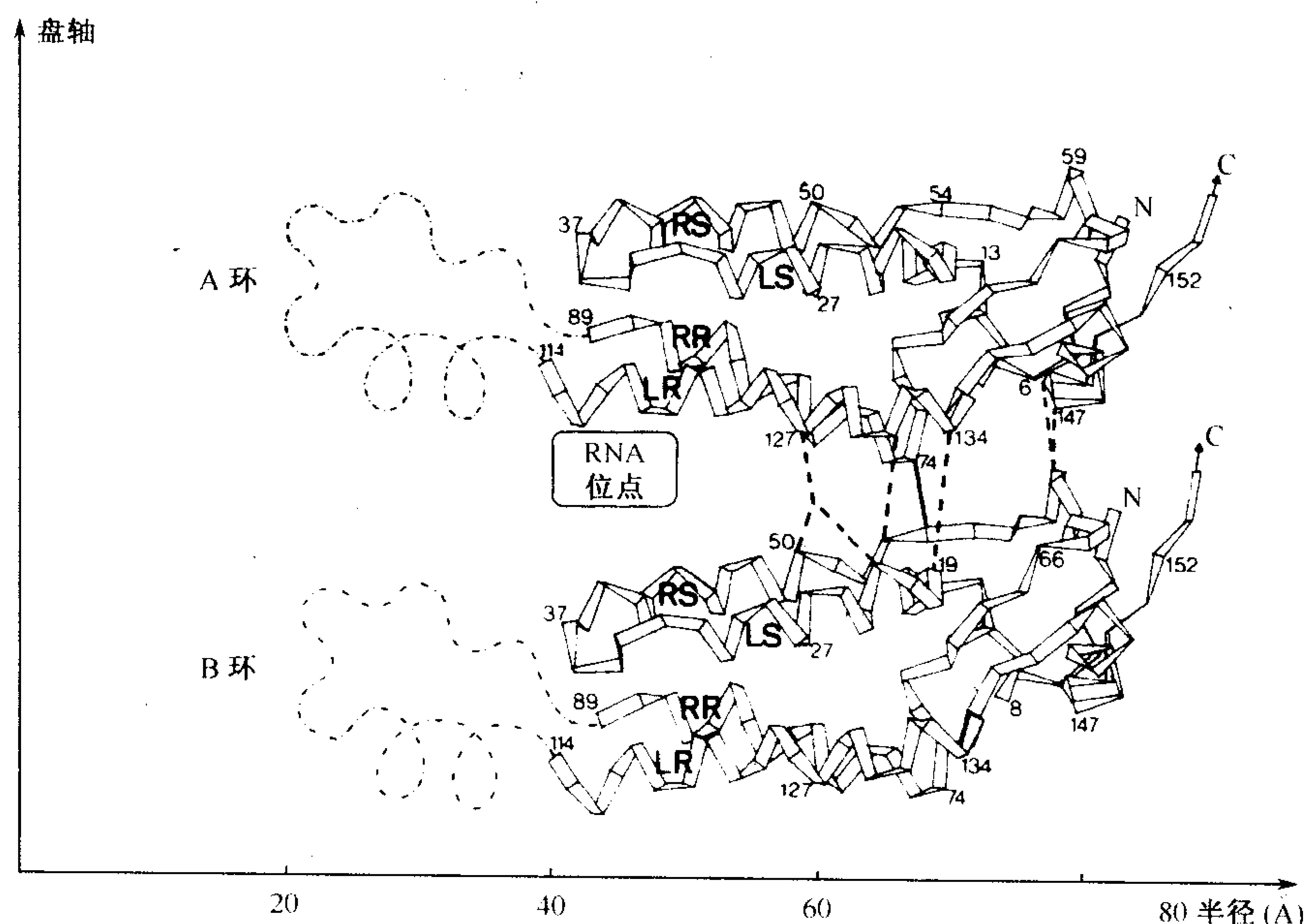


图 5.7 双盘的部分侧面观结构，显示蛋白亚基在两个环及其沿轴向接触互作的相对位置。共存在 3 个发生互作的区域：脯氨酸 54 与丙氨酸 74、缬氨酸 75 间的疏水性互作用实线表示，虚线表示苏氨酸 59 和丝氨酸 147 及 148 之间的氢键结合，其余的虚线表示延伸的盐桥系统。肽链的低半径区域由那些无 RNA 存在的无序结构组成，将 LR 螺旋延伸 1～2 圈然后向上转向垂直柱。主要的核苷酸结合位点可能在 RR 螺旋之下。承蒙版权所有者（MacMillan Magazines Ltd.）的惠允，引自 Bloomer 等（1978）。

最外面的互作是丝氨酸 147、丝氨酸 148 与苏氨酸 59 间的极性互作。在稍低的半径下最大的互作区域是一个盐桥系统，包括一个复杂的氢键的三维网络，其中包括两个水分子的参与。最里面的互作位于一个小的疏水区，丙氨酸 74 和缬氨酸 75 都与脯氨酸 54 的环接触。因此，两个盘在外部接触，像一对颌（颚，jaw）向中心敞开。折叠链的易弯曲的内部在图 5.7 中用点线表示。其他物理研究显示在这一区域存在热运动的无序（thermal motional disorder）而非静态的无序（Jardetsky *et al.*，1978）。

5. 病毒的结构

完整的 TMV 在溶液中并不形成规则的三维晶体排列结构。正因如此，有关双盘的细致结构分析一直没有进展。Stubbs 等（1977）应用纤维衍射方法（fiber diffraction method）在分辨率达到 4 Å 的水平上解析了其结构。利用这一数据及其他已有的数据，他们建立了该病毒的一个结构模型（图 5.8）。

Namba 和 Stubbs（1986）在分辨率达到 3.6 Å 的水平上确定了 TMV 病毒的结构，

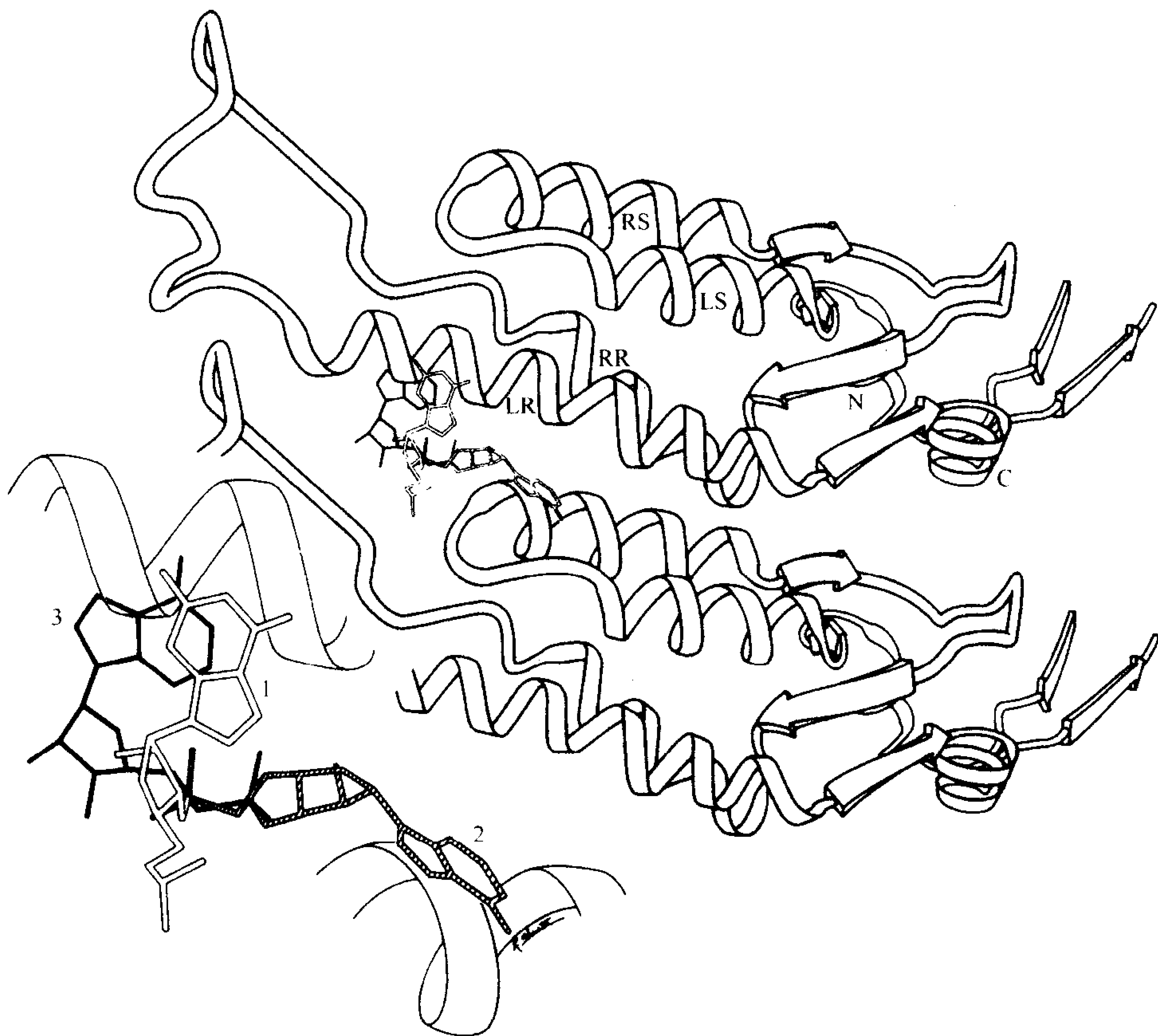


图 5.8　TMV 外壳蛋白的二级结构。图中显示了 2 个蛋白亚基和 3 个 RNA 核苷酸 GAA（分别标记为 1、2 和 3）组成的基本骨架结构。放大的 RNA 位于图的左下方，每个核苷酸颜色（灰度）的深浅不同。α 螺旋的名称见图 5.6。N，N 端，从这个角度看很不清晰；C，C 端。病毒的轴是垂直的，位于图的左侧。经允许，引自 Namba 等（1989）。

对 Stubbs 等（1977）的模型在一些结构细节方面进行了细化，有助于我们对病毒装配的理解。Namba 等（1989）获得了分辨率 2.9 Å 的更精细的结构，得到了大量详细的信息。以下的讨论主要基于 Namba 和 Stubbs（1986）的结构模型，一些重要的特征为：

a. 外表面

如上所述，N 端和 C 端位于病毒表面。但 C 端最后的第 155～158 位残基并不在密度图中，因而被认为部分无序（Namba and Stubbs，1986）。

b. 内表面

RNA 的存在使病毒的蛋白亚基的内部稳定，因而核酸的位置可以确定。在经向密度分布中最高的峰大约在 2.3 nm 处。这一位置由含有 V 螺旋的垂直链所占据（Namba and Stubbs，1986）。这些链充满 0.9 nm 宽、2.3 nm 高的空间，这些 RNA 紧密装填在一起形成围绕轴孔的一道致密墙以保护 RNA 远离介质（medium）。

c. RNA 结合位点

RNA 结合位点分为两部分，由一个亚基的顶部和相邻亚基底部组成。三个碱基与每

个蛋白亚基结合，形成一个爪，紧握住顶部亚基的左径向螺旋（LR）。左径向螺旋位于第117和128位之间，有大量的脂肪族残基，形成与碱基结合的3个面。碱基倚着疏水侧链，每个面都可以容纳任何碱基。RNA结合位点的其他部分主要位于右回转螺旋（RS）。

两个磷酸基团与Arg90与Arg92间形成离子配对。第三个磷酸基团可能与Thr37形成氢键（Namba and Stubbs，1986）。Arg41与Arg90一样向同一个磷酸基团延伸，但没有紧密地接近。Namba等（1989）提出蛋白质与RNA间的静电互作最好看作蛋白质与RNA静电表面的互补，而不是精氨酸与磷酸之间的简单的离子配对。

d. 涉及装配（assembly）**和解装配**（disassembly）**的静电互作**

Caspar（1963）和Butler等（1972）得到的结果表明，在TMV中存在着不规则pK值（接近pH 7.0）的羟基对（pair of carboxyl group）。Namba和Stubbs（1986）在他们的模型中鉴定了可能就是由Caspar所提出的两个亚基间羧基的配对：位于2.5nm半径处的侧面-侧面界面的Glu^{95}-Glu^{106}，和位于5.8nm半径处的顶部-底部界面的Glu^{50}-Asp^{77}。这些基团在病毒的装配与解装配中可能发挥着重要作用（见第Ⅳ节A和第7章第Ⅱ节B）。

Namba等（1989）鉴定了三个位点，分别来自不同分子的负电荷在亚基界面（subunit interface）的这些位点处并列（juxtaposed）。这些位点产生的静电势，可用于驱动粒子的解装配：

1）一个低半径（接近轴心）的羧基-羧酸酯基对（carboxyl-carboxylate pair）可能结合钙离子。

2）一个磷酸-羧酸酯基对也可能结合钙离子。

3）一个高半径的羧基-羧酸酯基对在轴的界面上。它不能结合钙离子，但可以结合一个质子，因而可用滴定法测定不规则的pK值。

e. 水的结构

水分子广泛分布于蛋白亚基的表面，既位于病毒的外表面和内表面，又位于亚基接触界面中（Namba *et al.*，1989）。

f. TMV蛋白对RNA的特异性

Gallie等（1987）研究表明TMV蛋白不与DNA装配，即使包括装配起点序列也是如此。Namba等（1989）推断这种专一性一定涉及核糖的羟基之间的互作，因为所有的三碱基结合位点均可能易于接纳胸腺嘧啶。

C. 烟草脆裂病毒属（*Tobravirus*）

烟草脆裂病毒（TRV）是与TMV采用相同的策略构建成的僵直的圆柱状杆体。TRV需要两种粒子，一种长杆状粒子和一种短杆状粒子，二者相互配合产生完整的病毒粒体。这一方面的内容将在第6章第Ⅷ节H.2中讨论。在这里我们将考虑长杆状粒子的结构。短杆状粒子被认为是使用与长杆体相同的蛋白亚基，并采用相同的方式构建的。

关于该病毒结构的大多数信息都是通过对甲酸双氧铀染色病毒粒体的电镜观察得到的（Offord，1966）（图5.9）。一些信息通过光学衍射得到。对于Offord所研究的株系来说，具侵染性的长粒子长约191 nm，直径25.6 nm，螺距为2.55 nm，每三圈含有76个蛋白亚基。中央孔的半径约为2.7 nm。在大约8.2 nm的半径处，可观察到环纹

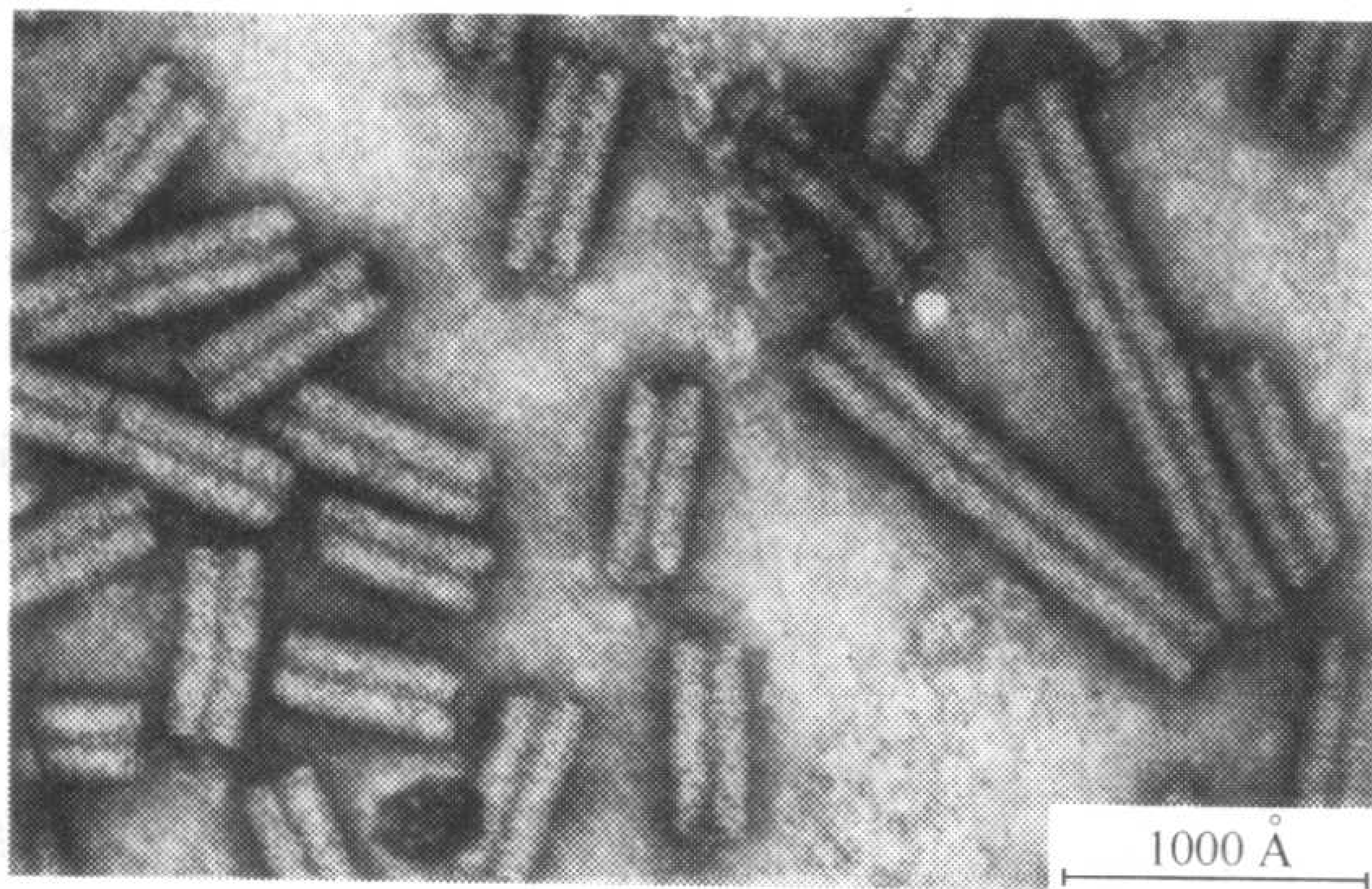


图 5.9 烟草脆裂病毒（TRV）的电子显微照片表现出甲酸双氧铀负染的病毒长杆与短杆粒体。经允许，引自 Offord（1966）。

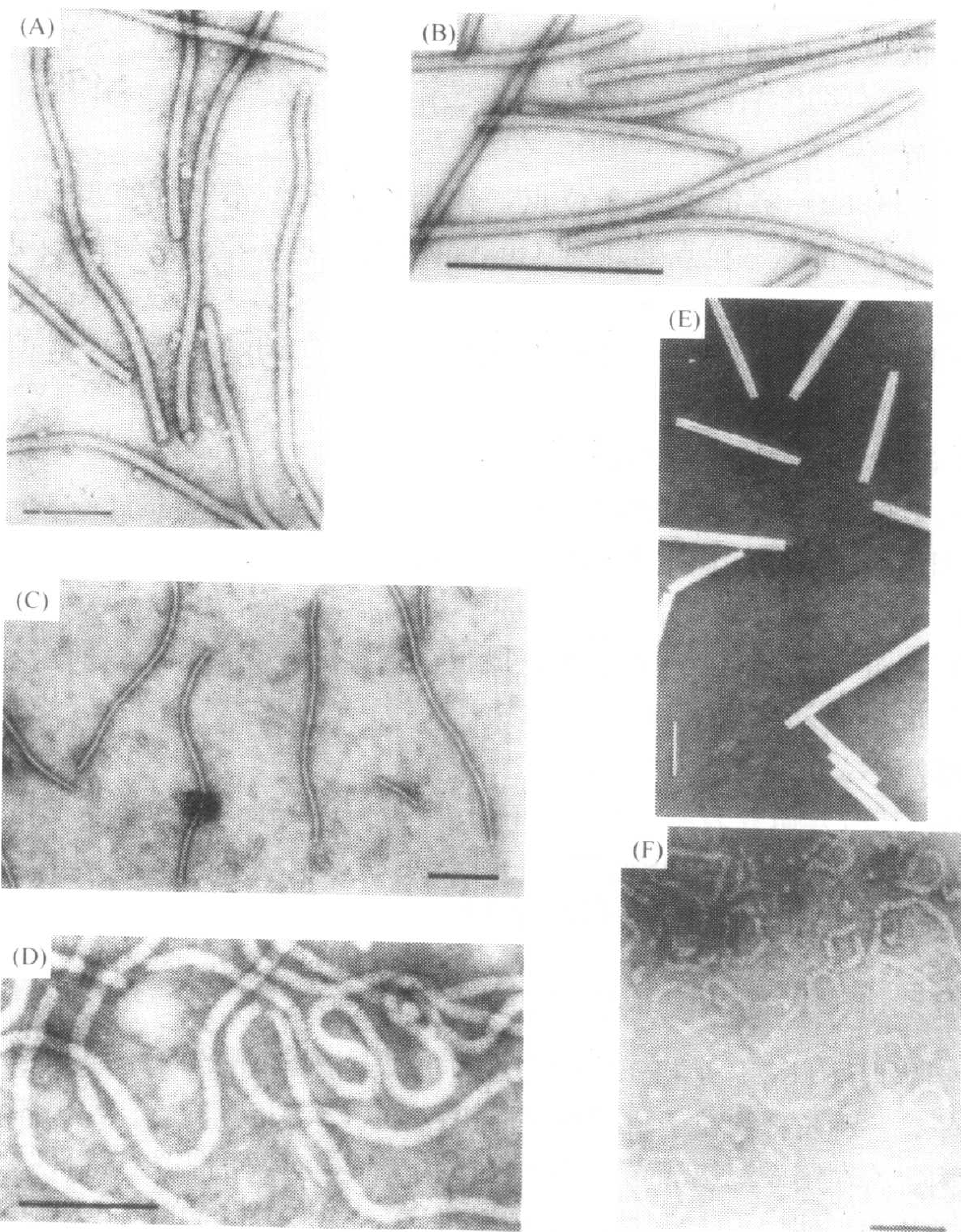


图 5.10 各病毒组群的代表性成员的病毒粒体的负染电镜照片。（A）马铃薯 X 病毒属的 PVX，标尺＝100 nm（引自 Brunt *et al.*，2000a）。（B）香石竹潜隐病毒属的 CLV，标尺＝250 nm（引自 Brunt *et al.*，2000b）。（C）马铃薯 Y 病毒属的 PPV，标尺＝100 nm（引自 Berger *et al.*，2000）。（D）长线病毒属的 CTV，标尺＝100 nm（引自 Martelli *et al.*，2000a）。（E）大麦病毒属的 BSMV，标尺＝50 nm（引自 Lawrence *et al.*，2000）。（F）纤细病毒属的 RHBV，标尺＝100 nm（引自 Mayo *et al.*，2000），均获得使用许可。

特征（annular feature），它可能是 RNA 链。在杆状粒子的横切面的这一区域观察到一个致密染色的环（Tollin and Wilson，1971）。Offord 所研究的株系具有 72 圈螺旋，每个蛋白亚基可能对应于 4 个核苷酸，共有 7100 个核苷酸。

Harrison 和 Woods（1966）注意到，在他们的众多不同的 TRV 分离物的电子显微照片中，粒子的两个末端有不同的形状。一个末端稍凸起，另一末端的轴心略微向外倾。他们认为粒子末端的这种外形可能是源于香蕉形的蛋白亚基的长轴与病毒粒体的长轴没有精确地倾斜成 90°角所致。

与 TMV 外壳蛋白一样，TRV 的外壳蛋白在溶液中以各种不连续的聚集状态存在。特别是已观察到可能参与病毒装配的沉降系数为 35S 的一个双盘结构（Gugerli，1976）。

D. 其他螺旋对称结构的病毒

其他螺旋对称的杆装病毒的具体结构已在表 5.1 中列出，一些弯曲的杆状病毒的电子显微照片参见图 5.10。

表 5.1　其他杆状病毒的特征

病毒属	粒子长度/nm	粒子直径/nm	杆状类型[a]	螺距/nm	圈数/重复	亚单位数/圈	轴向孔洞	文献
Hordeivirus	110～150（m）[b]	20	R	2.5	ND[c]	ND	Y[d]	1
Furovirus	140～160，260～300（m）	20	R	2.4～2.5	ND	ND	Y	2
Pomovirus	65～80，150～160，290～310（m）	18～20	R	2.4～2.5	ND	ND	Y	3
Pecluvirus	190，245（m）	21	R	2.6	ND	ND	Y	4
Benyvirus	85，100，265，390（m）	20	R	2.6	ND	ND	Y	5
Potexvirus	470～580	13	F	3.3～3.6	4～11	8～9	Y	6
Carlavirus	610～700	12～15	F	3.4	ND	ND	ND	6
Potyvirus	680～900	11～13	F	3.4～3.5	ND	ND	ND	6
Capillovirus	640～700	12	F	3.4～3.8	9～10	ND	ND	6
Trichovirus	640～760	12	F	3.4～3.8	c10	9.3～9.8	ND	6
Vitivirus	725～825	12	F	3.8	5	8～9	ND	6，7
Closterovirus	1250～2000	12	F	3.4～3.8	5	9～10	ND	6，7

注：a：R＝僵直杆；F＝弯曲杆；b：（m）＝多分体病毒；c：ND＝未确定，或对于轴孔而言未检测到；d：Y＝存在。

文献：1. Laurence 等（2000）；2. Torrance（2000）；3. Koenig 和 Lesemann（2000a）；4. Fritsch 和 Dollett（2000）；5. Keonig 和 Lesemann（2000b）；6. Tollin 和 Wilson（1998）；7. Tollin 等（1992），均获得引用许可。

对于很多此类病毒，还没有外壳蛋白螺旋排列的详细资料的信息，因为很难用光学或其他衍射技术分析这些病毒。这些直杆状病毒的基本结构很可能与 TMV 和 TRV 相

似。不过，值得注意的是，直杆状粒子的直径（约 20 nm）大于弯曲的杆状粒子的直径（11～13 nm），直杆状粒子的螺距（2.4～2.6 nm）小于弯曲杆状粒子的螺距（3.3～3.8 nm）。弯曲的杆状粒子的柔韧性可能来自它们较为松散的结构。

通过单克隆抗体测定了真菌传杆状病毒属的 SBWMV 和马铃薯帚顶病毒属的 PMTV 这两种直杆状病毒的抗原结构（Chen *et al.*，1996；Pereira *et al.*，1994）。这些研究表明，与 TMV 一样，它们的外壳蛋白亚基的末端位于或接近粒子的表面。

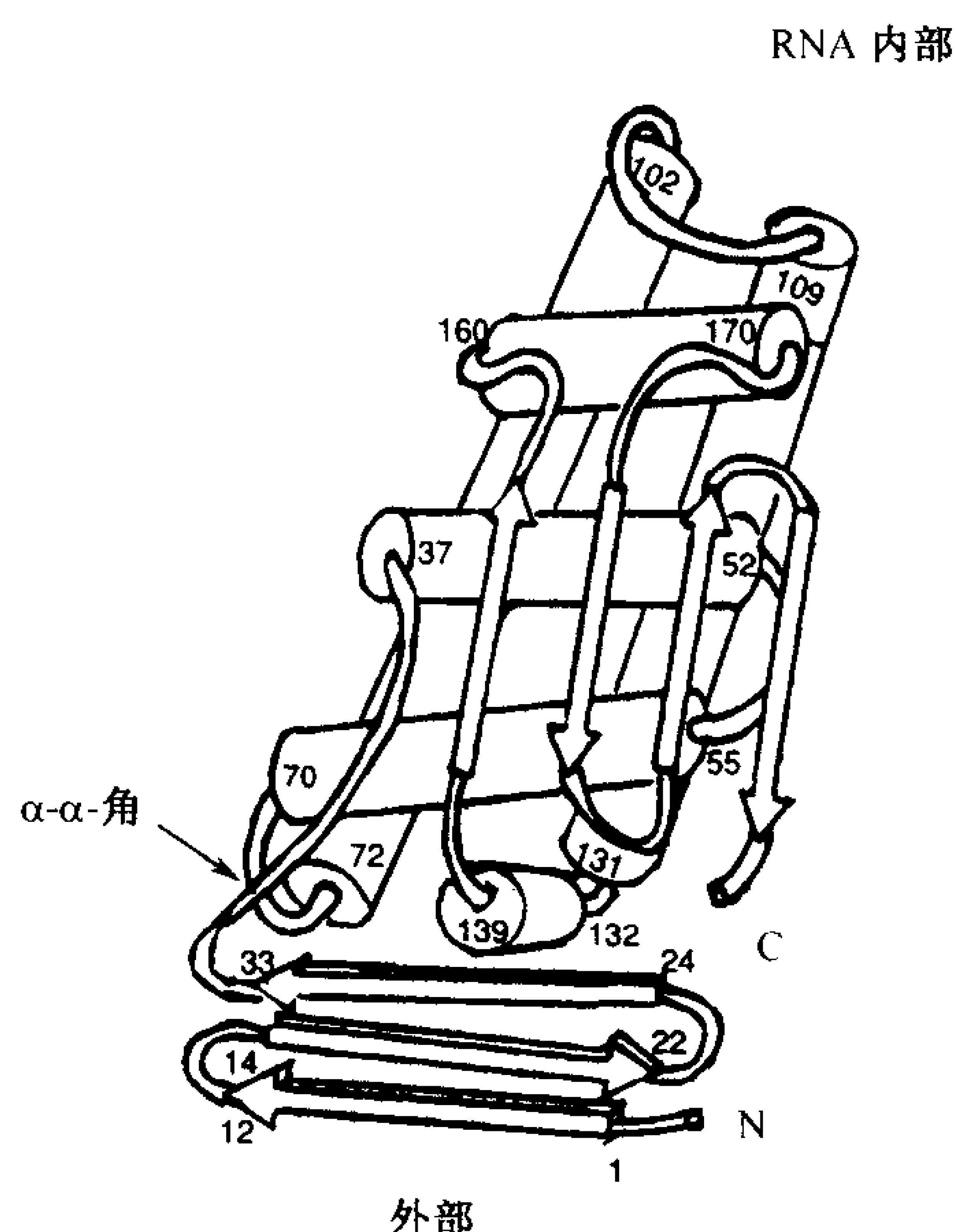


图 5.11　PVX 外壳蛋白多肽链折叠的示意图。α 螺旋以柱面表示，β 折叠以箭头表示。N 和 C 分别为多肽链的 N 端和 C 端。一些氨基酸残基的位置由数字表示。经允许，引自 Baratova 等（1992）。

对易曲的杆状病毒最细致的结构研究是以马铃薯 X 病毒属病毒（potexviruses）为材料进行的（Tolin and Wilson，1988）。圆二色性研究显示，NMV 和 PVX 外壳蛋白的二级结构具有大量的 α 螺旋（45%）及很少的 β 折叠（Wilson *et al.*，1991）。螺距随测定时的湿度而变化。同样地，马铃薯 Y 病毒属一些病毒粒体的长度受二价阳离子的存在与否的影响。在有镁离子存在时，PepMoV 粒子长度为 850 nm，但当其暴露于 EDTA 时其粒子长度仅为 750 nm（Govier and Woods，1971）。

通过氚层析 X 射线照相术（tritium planigraphy）研究了 PVX 粒子蛋白亚基的结构（Baratova *et al.*，1992）。用热激活的氚原子轰击病毒粒体并估计氚标记在分子内的分布。未修饰的外壳蛋白的 N 端区域最易于接受热的氚，C 端区域则完全不与之接近。Baratova 等通过这些结果和推测的二级结构建立了 PVX 的外壳蛋白模型（图 5.11）。

长线病毒属病毒 BYV 编码一个与其主要外壳蛋白（p22）结构相似、但稍微大一些的结构相关的蛋白质（p24，其 N 端有附加序列）（参见第 6 章第Ⅷ节 F.1.b）。Agronovsky 等（1995）用外壳蛋白（p22）的抗血清和 p24 N 端的抗血清检测 BYV。这种易曲的病毒粒体 3′端的一个 75 nm 的片段一致地被这两种抗血清所标记（Zinovkin *et al.*，1999），而 N 端的抗血清不能标记病毒粒体的其余部分（图 5.12），呈现出似响尾蛇的结构。在 CTV 上也发现了相类似的情形（Febres *et al.*，1996），可能适于所有的长线病毒属的病毒，在毛形病毒属病毒（crinivirus）LIYV 上也发现了这种情况（Tian *et al.*，1999）。

此处还应该提及纤细病毒属病毒（tenuiviruses），它们在电子显微照片中呈现为折叠、分支、盘绕的丝状粒子（Toriyama，1986b）。这些粒子的制备物具有侵染性。

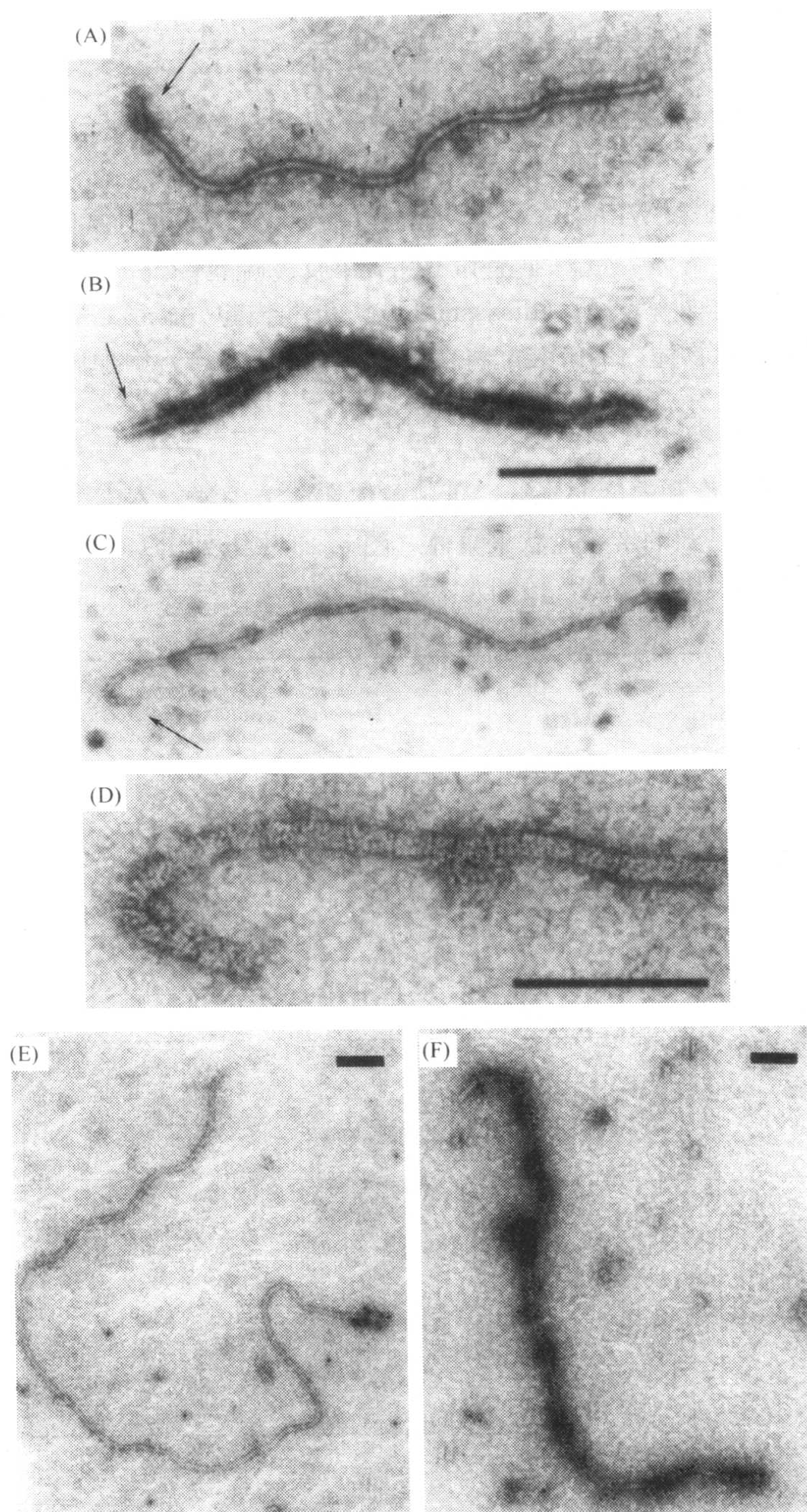


图 5.12　长线病毒属病毒粒体上的“响尾蛇”尾。(A) ～ (D) BYV 病毒粒体。(A) 用鼠多克隆抗 BYV p24 的 N 端多肽血清标记 BYV 粒子。(B) 用兔抗 BYV 血清和羊抗兔二抗胶体金复合物 (10 nm) 标记病毒粒体。(C) 未标记 (醋酸双氧铀染色)、具有清晰末端结构的病毒粒体。(D) 更高放大倍率的图 (C) 内显示的末端结构，箭头指向清晰的病毒尾部。(E) ～ (F) CTV 病毒粒体。(E) p27 抗体金标记的粒子。(F) 蛋白衣壳抗体金标记的粒子。标尺，(A) ～ (C) 300 nm，(D) ～ (F) 100 nm。承蒙版权所有者 (© National Acadmy of Sciences) 的许可，(A) ～ (D) 引自 Agronovsky 等 (1995)；承蒙版权所有者 (© The American Phytopathological Society) 的惠允，(E) 和 (F) 引自 Febres 等 (1996)。

第Ⅳ节　杆状病毒的装配

A. TMV

Fraenkel-Conrat 和 Williams（1955）的先驱性工作，即通过碱性缓冲液对病毒制备物反向透析将 TMV 解体为蛋白亚基和 RNA 并通过硫酸铵沉淀从核酸中分离蛋白质，促进了参与病毒的体外解装配（disassembly）和重装配（reassembly）因素的深入研究。有关 TMV 在植物体内的解装配将在第 7 章（第Ⅱ节 B）中加以讨论。

1. TMV 外壳蛋白的装配

受 pH、离子强度和温度的影响，蛋白单体在溶液中能以不同的方式聚集。主要形式见图 5.13。一种已知的堆叠盘状聚集体（图 5.13 中未列出）是由三对或多对蛋白亚基环组成（Raghavendra *et al.*，1986）。

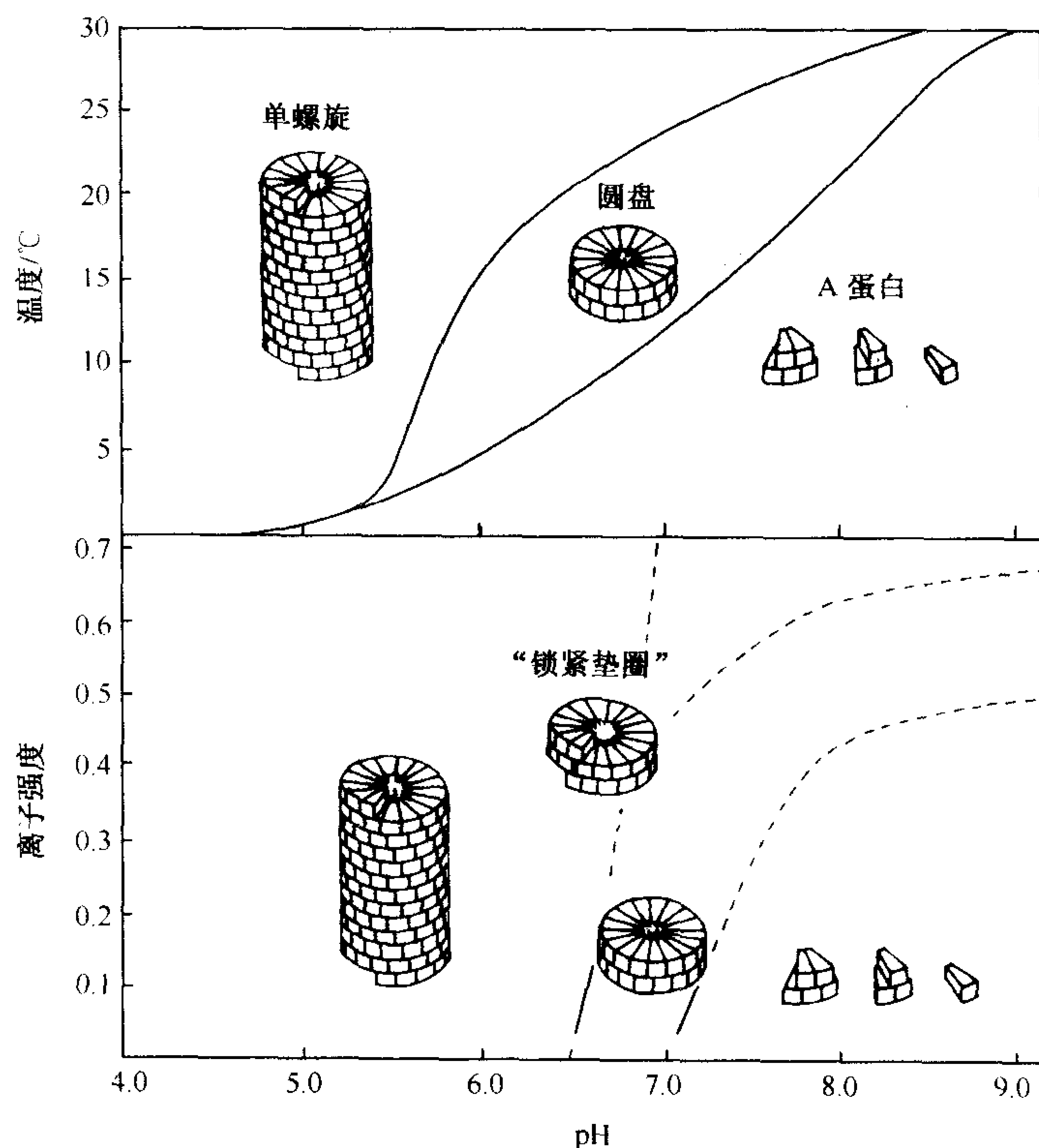


图 5.13　TMV 外壳蛋白的一些聚集态。pH、离子强度和温度的影响。螺旋杆状、A 蛋白和 20S 盘的特性已被深入研究（Champness *et al.*，1976）。锁紧垫圈（lock washer）被认为是 TMV 装配起始的中间体（Durham *et al.*，1971）（图 5.15）。尽管锁紧垫圈尚未被分离出来，但在 pH 降低时快速形成具"刻痕的"（nicked）蛋白螺旋直接支持这种形式的存在（Durham and Finch，1972.）（参见第 7 章第Ⅲ节 A.9）。上图修改自 Richards 和 Williams（1976）；下图修改自 Durham 等（1971），均经允许。

单克隆抗体实验显示在盘上外壳蛋白亚基的两个末端都暴露出相同的蛋白亚基表面。因此，在垛层中的两层单位必定是双极的（即朝向两个方向）（Dore *et al.*，1989）。

一个四层盘的聚集体已被结晶，其结构已解析到原子的分辨率（Diaz-Avalos and Caspar，1998）。结果表明该结构由多层盘组成。

这些聚集体的存在对我们理解病毒如何装配和对经X射线分析以获得对病毒的细致结构的理解都是很重要的。在低pH的条件下产生两种螺旋状的蛋白质杆，一种像在病毒里的一样每圈螺旋$16\frac{1}{3}$个亚基，另一种每圈螺旋$17\frac{1}{3}$个亚基。在这两种形式中蛋白亚基的结构与病毒中的很相似。至少一个阴离子在一个磷酸基团结合位点附近取代了RNA（Mandelkow *et al.*，1981）。有关在不同烟草花叶病毒属病毒的外壳蛋白中发现的可允许的氨基酸替换的限制已在第2章（第Ⅱ节D）中讨论过。

2. TMV杆体的装配

a. 体外装配

Fraenkel-Conrat和Williams（1955）的经典实验结果表明，TMV的外壳蛋白和TMV的RNA可以再装配（reassemble）成完整的病毒粒体。单独的TMV RNA具有完整病毒粒体0.1%的侵染活性。重新组成的病毒杆体显著地增加了比侵染性（specific infectivity）（为天然病毒的10%～80%），并且这种侵染性可抵抗RNA酶的攻击。自这些早期的实验开始，很多工作者研究了该病毒杆体的装配机制，因为该课题具有相当普遍的意义。现已知道外壳蛋白在原子水平的三维结构（见图5.6、图5.7和图5.8），TMV的很多株系和相近病毒的核苷酸全序列均已确定。这一系统为研究由RNA与蛋白质装配成大分子过程中的互作提供了一个有用的模型。

杆状粒子的装配有4个方面要考虑：杆状粒子在RNA上开始形成的位点；杆状粒子开始形成的初始成核（initial nucleating）事件；杆状粒子向5′方向延伸；杆状粒子向3′方向延伸。在涉及起始位点和起始事件的细节方面存在普遍的共识，但对延伸过程的实质还存在一些争议。

中心问题是外壳蛋白单体可以以多种聚集状态存在，而其存在紧密依赖于介质的条件（图5.13）。不同聚集体之间存在着平衡，因而，在一个给定的实验条件下一种聚集体可能占优势，其他聚集体可能少量存在。这一方面的情况已由Wilson和McNicol（1995）、Butler（1999）和Klug（1999）做了综述，主要有以下几方面内容：

i. RNA分子内的装配起点（assembly origin）

外壳蛋白并不是以随机的方式与RNA结合。Zimmern和Wilson（1976）确定装配起始位点位于距3′端900～1300个核苷酸处。Butler等（1977）和Lebeurier等（1977）提供了证据表明较长的RNA尾部折叠下来并进入杆状粒子的轴向孔中。Lebeurier用电子显微镜观察到在部分装配的杆状粒子中RNA的一个长尾和一个短尾都从杆状粒子的一端伸出来。随着杆状粒子延长，较长的尾部不见了。然后短尾整合进去，完成杆状粒子的形成。这些实验和其他实验（Otsuki *et al.*，1977）证明了存在着内部的装配起点。装配起点的核苷酸序列是由许多工作者（Zimmern，1977；Jonard *et al.*，1977）通过对TMV普通株系的研究而确定的。在起始位点附近的核苷酸序列能形成如图5.14所示的相当广泛的内部配对区。烟草花叶病毒属一些病毒的装配起点定位在其他区域，当这一起点位于外壳蛋白的亚基因组mRNA上也具有的区域时，可形成短的杆

状粒子。

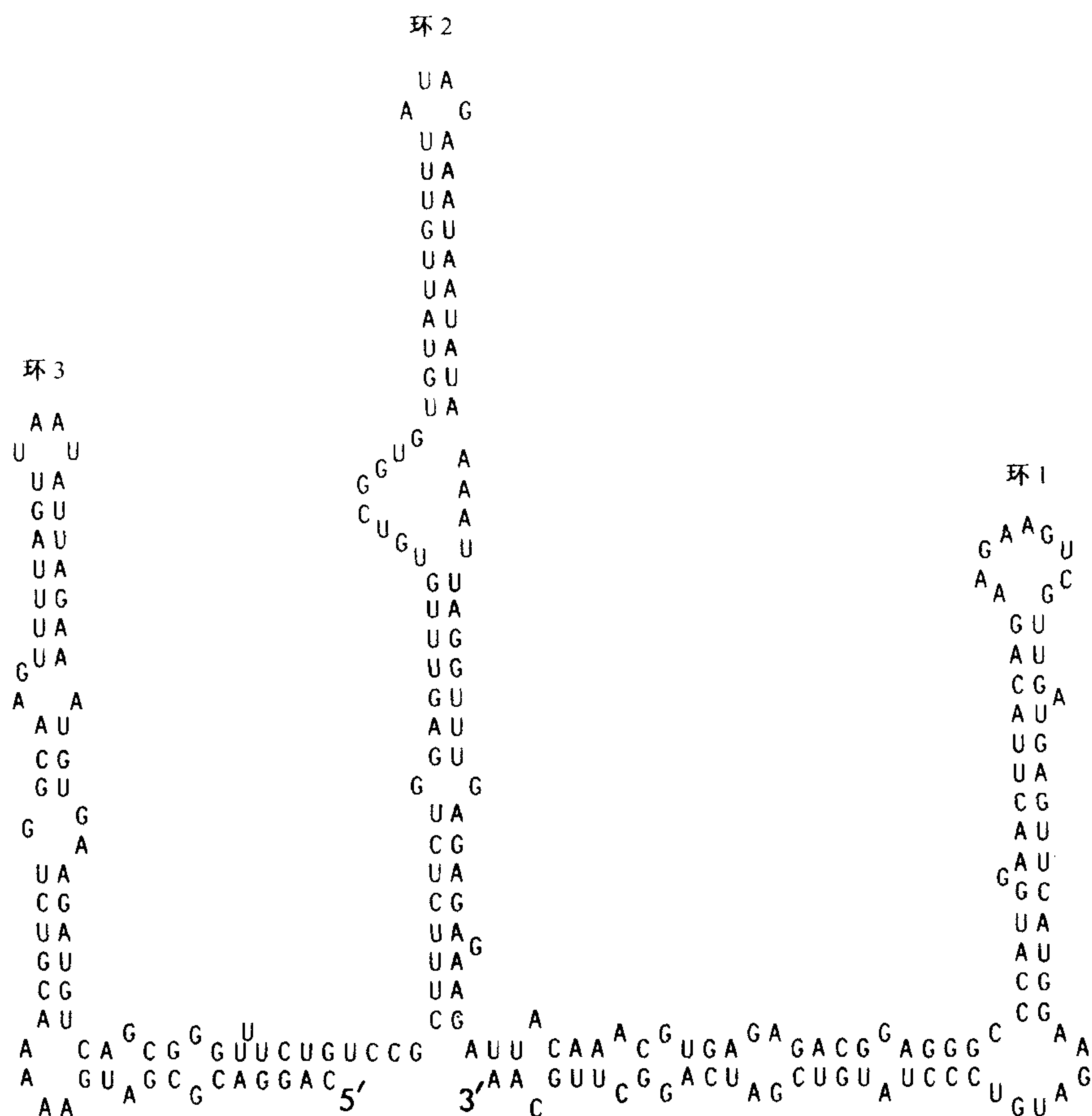


图 5.14　TMV 装配起点处的可能二级结构，包括病毒序列的第 5290 位至第 5527 位核苷酸。承蒙版权所有者（Oxford University Press）的惠允，引自 Zimmern（1983b）。

图 5.14 上的环 1（loop1）的序列 AAGAAGUCG，首先与外壳蛋白的 20S 聚集体结合。Steckert 和 Schuster（1982）在低温和低 pH 的条件下分析了 25 种不同的三核苷二磷酸（trinucleoside diphosphate）与聚合的 TMV 外壳蛋白的结合。其中 5′-AAG-3′ 的结合能力最强。在用病毒重构的条件下，较长的寡聚物［$(AAG)_2$ 或 AAGAAGUUG］是强力结合所必需的（Turner *et al.*，1986）。环 1 各个部分的重要性已经通过细致的定点突变得以确定（Turner and Butler，1986；Turner *et al.*，1988）。这些研究显示特异性的装配起始在缺少图 5.14 中的环 2 和环 3 的条件下仍可发生，但环 1 是必不可少的。环 1 中未配对序列的缺失或改变则终止快速装配。环 1 的结合主要是源于有规律地隔开的 G 残基。序列 $(UUG)_3$ 和 $(GUG)_3$ 与天然序列一样有效。但 $(CCG)_3$ 和 $(CUG)_3$ 等序列会降低装配起始的速率。因此，前两个位置的碱基存在一定的自由度（latitude）。

位于环 1 的茎部的碱基序列并不关键，只是在剪短茎部的长度后会减少蛋白质结合的

效率，因为这样做会改变靠近这个环的 RNA 折叠结构（Turner *et al.*，1988）。环 1 的整体稳定性十分重要的，因为使得茎的碱基配对加强或减弱的碱基改变对蛋白质的结合都是有害的。在茎底部的小环也是重要的，但它对于顶部环的相位不是关键性的。

上述的讨论都是基于 TMV 的普通（vulgare）株系的情况，其他烟草花叶病毒属病毒的茎环结构序列稍微有些不同。通过对这些序列的比较，Okada（1986b）指出在该环中有一个不同的目标序列，即 GAAGUUG。一些其他烟草花叶病毒属病毒的装配起点位于基因组的不同位点。如 SHMV 的装配起点位于外壳蛋白基因内（Takamatsu *et al.*，1983），因而外壳蛋白的亚基因组 RNA 可被包装（壳）。

ii. 起始的成核事件

自从 Butler 和 Klug（1971）证明一个 20S 的外壳蛋白多聚物负责 TMV 杆状病毒装配的起始以来，这一发现已被许多学者通过多种方法证实。20S 双盘结构已在原子分辨率的水平被解析（图 5.7）。多年以来这一直被认为是起始装配的构型，并与 RNA 上的装配起始序列相互作用，该盘会转变为一个原螺旋形式（protohelical form）。图 5.7 所示的结构源自在高离子强度溶液中 20S 聚集体的晶体，而且双盘结构也被认为是在重构条件下最有利的结构。通过沉降平衡（Correia *et al.*，1985）、近紫外圆二色性（Raghavendra *et al.*，1985）和电子显微镜技术（Raghavendra *et al.*，1986）在运用杆状粒子重新装配实验中的盐和温度条件下的研究表明，所观察到的 20S 螺旋聚合体含有 39 ± 2 个亚基。然而，利用快速冷冻技术直接证明，在有利于 TMV 最快速装配条件下的溶液内，大约 80% 的外壳蛋白以只与一个双环聚集体兼容的结构存在（Butler，1999）。因此，在溶液中的主要结构可能与在晶体状态下发现的主要结构相同（图 5.7）。

当然，由 Champness 等（1976）提出的模型主要是基于功能方面的考虑。在低 pH 的条件下这些盘可以形成一个长度不定的延长的螺旋杆状粒子。在螺旋与双盘结构间的转变主要是由一个涉及非正常滴定的羧基基团的转换机制所控制。在低 pH 的条件，因为羧基的质子化，蛋白质自身能形成一个螺旋。当蛋白质在低 pH 时处于螺旋状态或在病毒内与 RNA 结合时，都存在内部连锁的垂直螺旋。在这种条件下，推断异常滴定的羧基集团被迫结合在一起。Champness 等提出双层盘的内部像一对颚（图 5.7）一样特异地与 RNA 上的装配起始环结合（图 5.14），在这个过程中将每个双盘的盘转变为“锁紧垫圈”（lock washer）并形成一个原始螺旋。TMV 装配早期的模型如图 5.15 所示。

iii. 杆状粒子沿 5′方向延伸

随着杆状粒子装配的起始，粒子在 5′方向快速增长（Zimmern，1977），沿着中心孔向上牵引 RNA 直到大约 300 个核苷酸被包裹为止。Zimmern（1983b）提出一个由位于 5′端和装配起始环之间的另外两个发夹环参与起始，并快速装配的模型（图 5.14）。这些环之间的间隔与它们依次与三个双盘结构相互作用的观点相一致。很多学者已经分离到几类确定长度的部分装配的杆状粒子。至少其中一些可能是由于 RNA 的一些二级结构区域在某些特定杆状粒子长度处阻滞粒子继续延长所致（Godchaux and Schuster，1987）。

一般认为杆状粒子在 5′方向比 3′方向延伸得快，但在其他方面存在相当多的分歧。Butler 的研究小组认为 20S 聚集体是于 5′方向延伸，在 3′方向使用 A 蛋白，形成完整的杆

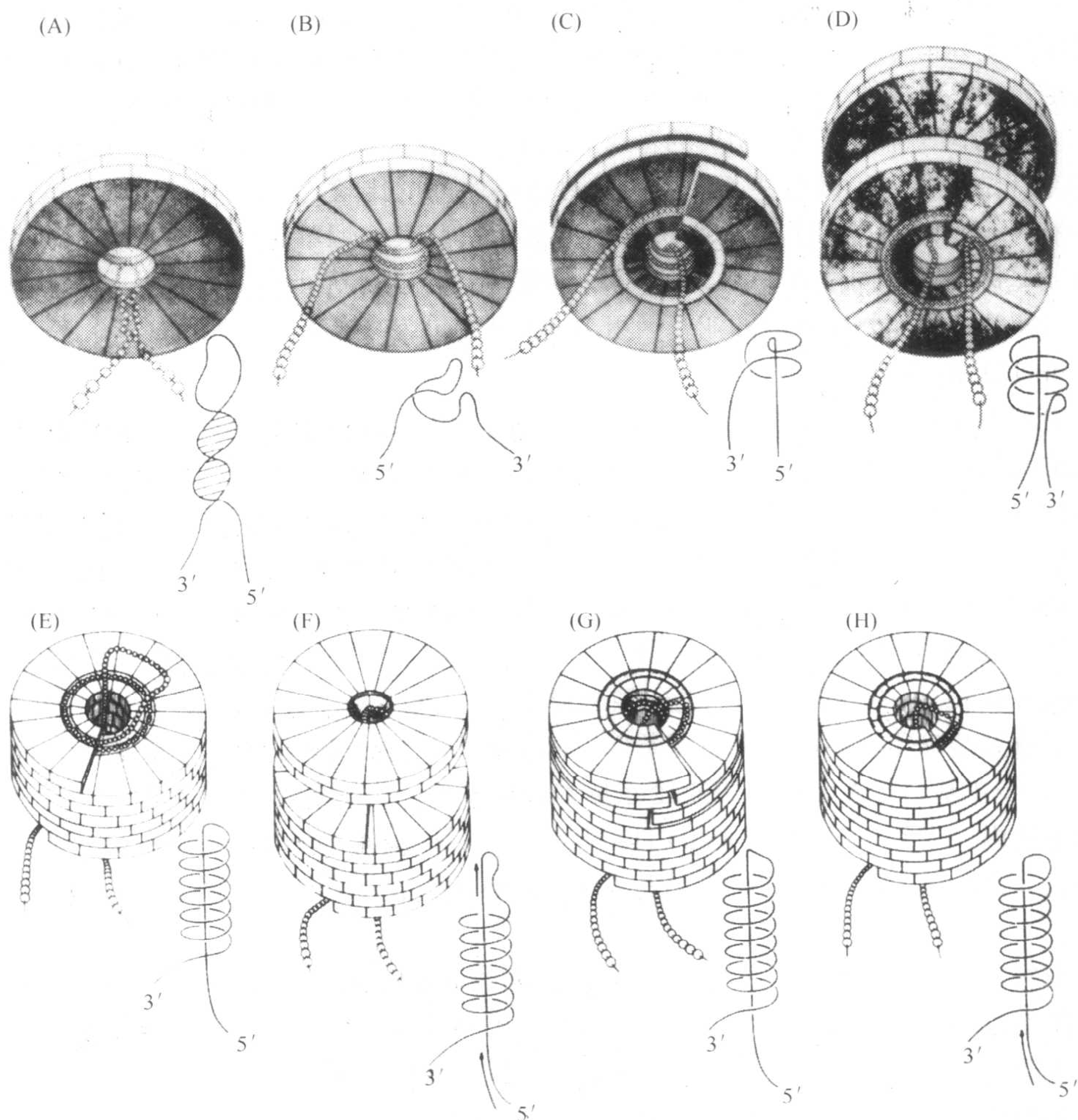


图 5.15 TMV 的装配模型；(A)～(C)起始；(D)～(H)延伸。(A) 发夹环插入 20S 圆盘的中央孔内，从圆盘的底部插入。还不清楚进入的正确一侧是如何选择的。(B) 当 RNA 引入亚基的双层之间时其环打开。(C) 这种蛋白质与 RNA 的互作引起圆盘转换为螺旋式紧锁垫圈形式［一种原螺旋（protohelix)］，两个 RNA 尾巴都从同一端突出来。螺旋锁紧垫圈-RNA 复合体是螺旋状杆的起始点。(D) 第二个双盘从远离 RNA 尾的另一端加到第一个上。它边加边转变成螺旋形，因而 RNA 的另外两圈被包裹（在亚基内）。(E) ～ (H) 螺旋状杆沿 5′方向继续延长，RNA 环不断收到圆盘因而其 5′尾逐步被拉入轴孔。在每个小图内均标出了 RNA 链的三维空间状态。承蒙 P. J. G. Butler 提供该图，谨表谢意。

状粒子需 5～7 min（外壳蛋白单体的聚集态见图 5.13）。Okada 课题组（Fukuda and Okada，1985，1987）提出 5′方向延伸使用 4S 蛋白，而在 3′方向延伸则使用 20S 聚集体，形成完整的杆状粒子需 40～60 min。Butler (1984)、Lomonossoff 和 Wilson (1985)、Okada (1986b) 细致地讨论了一些早期的相关实验。Fukuda 等 (1978) 的实验表明对于他们所使用的病毒株系和装配的条件而言，40～60 min 才能形成全长的杆状粒子。Fukuda 和 Okada (1985) 发现杆状粒子在 5′方向的延伸在 5～7 min 内产生一个 260 nm 的杆状粒子，该粒子随后沿 3′方向延伸产生 300 nm 长的杆状粒子。他们使用的是一个 TMV 的日本株系

和比 Butler 小组高的离子强度，这可能是造成一些差异的原因。

现在广泛接受的观点是，在最适宜的装配条件下，TMV 杆状粒子在 5′方向的延长主要是通过加入外壳蛋白的双盘或有时加入单盘实现的（Turner *et al.*，1989）。他们制备了 RNA 体外转录物，用异源的非病毒序列取代了 TMV 装配起点序列上游的 TMV 5′端的自然序列。该转录物不存在装配起点之后的 3′序列。然后，他们确定了装配开始较短一段时间后免受 RNA 酶攻击的 RNA 片段长度。他们发现一系列梯级长度片段，这些片段稍微超过 100 个核苷酸、偶尔仅仅超过 50 个核苷酸。与预期的被 2（或 1）圈蛋白质螺旋保护的 RNA 片段长度大约一致。他们发现无论使用何种异源 RNA 都能得到一致长度的片段。该实验排除了这些梯级片段是由于 RNA 序列的一些规律性结构可以沿着分子在一定距离处减慢装配的可能性。

还不确定 RNA 的 5′帽子结构是如何包壳的。通过核糖体使之解装配（参见第 7 章第Ⅱ节 B.4）和体内的解装配实验表明，5′端的结构可能与病毒粒体的大部分结构不同。

iv. 杆状粒子沿 3′方向延伸

Fairall 等（1986）研究了在不同位点由可杂交结合的短单链 cDNA 探针封闭的 RNA 的重装配。他们发现，即便由于被封闭的序列使 5′方向的延伸不完全，3′方向的延伸仍可以完成。但由于杆状粒子的长度是在温育 20 min 后测定的，因此，所得的数据与 3′方向的延伸是否在 5～7 min 内完成这一问题无关。

Fukuda 和 Okada（1987）制备了从装配起点到 3′端并与 TMV 的 RNA 互补的单链 cDNA 探针。他们使用这一方法以确定杆状粒子沿 3′方向延伸的长度。结果显示至少在前 4 min 内杆状粒子沿 3′方向显著的延伸并未发生。在 8 min 时延伸被首次发现，在 15～40 min间延长还在继续。在 4 min 时 RNA 的 5′方向确实存在明显的 RNA 的壳体化（encapsidation）。Fukuda 和 Okada（1987）在受保护的 RNA 材料中发现，在 3′方向存在一系列大小不同的 RNA，并提出这些片段在长度上存在大约 100 个核苷酸的差异。然而，他们文章的结果显示，在长度上有从 55～135 个核苷酸的不均匀增加。这种长度上的分散可能是由于核苷酸序列对于使用 A 蛋白进行装配以及对于核酸酶特异性的影响，而不是由于加入双盘结构所致。Turner 等（1989）用在 TMV 的装配起始序列的 3′端插入异源序列的 RNA 进行了装配实验，他们没有发现在受到保护的 RNA 中存在条带化（banding）的证据，这有力地支持了早期的研究工作，即杆状粒子在 3′方向的延伸是通过加入小的 A 蛋白聚集体实现的。

TMV 其他株系以及其他烟草花叶病毒属病毒的装配并没有像 TMV 的典型株系那样受到深入的研究。但现有的证据表明，这个基本相同的装配机制对所有这类病毒的装配都起作用。不过，装配所涉及的结构在细节上可能存在一些差异。

TMV 装配起点包埋于不同位点的体外重装配研究支持如下观点，即杆状粒子的延伸在 5′方向比 3′方向快，5′方向的延伸可能在 3′方向开始延伸之前就已完成了，这两个延伸反应互不相同（Gaddipatti and Siegel，1990）。

已经构建出将 TMV 的装配起点与外源基因 mRNA 结合的人造 RNA。这种 RNA 已用 TMV 外壳蛋白装配成杆状粒子，并用来将其引入植物细胞。

b. 体内装配

已在电子显微镜下观察到受侵染的叶片的抽提物（extract）中存在很短的杆状粒子，但 20S 聚集体在体内是否存在尚未确定。尽管如此，下面的证据显示前面所述的装配起始涉及的过程几乎肯定在体内发生：

(1) 在特定条件下（pH 7.0，0.1 mol/L 离子强度，20℃）体外装配的发生是最有效的，这一条件可被认为是合理的生理条件。

(2) 不同的烟草花叶病毒属病毒的装配起点与病毒包壳或含有外壳蛋白mRNA的短杆状粒子的包装之间的相关性，强烈地暗示着在体外发现的装配起始位点在体内也被使用。

(3) 与病毒体内装配有关的 *ts*（温敏）突变体 Ni2519 在其第 5332 位有一个单碱基变化（Zimmern，1983b）。该变化减弱了装配起点环附近的二级结构。

(4) 在 CAT 基因的 3′端插入 TMV 装配起始序列，转这种基因的烟草可发生相应的 RNA 转录，并且这种转录物在植株受 TMV 系统性侵染时可以用 TMV 的外壳蛋白装配成类似病毒的杆状粒子（Sleat *et al.*，1988b）。

通过体外实验已了解到 TMV 外壳蛋白可以与其他 RNA 形成杆状粒子。在体内，所形成的大多数杆状粒子含有同源 RNA，并表现出实质的特异性。这种体内的特异性可能源于：①正确的 RNA 与 20S 盘的特异性识别；②杆状粒子在同源的病毒 RNA 占优势的细胞内装配；③协调 RNA 复制和病毒粒体的装配。不过，体内装配的忠实性并非是全部的（参见第 8 章第 X 节）。

还没有证据确定 TMV 杆状粒子在体内延伸的方法，但没有理由认为体内装配机制与已提出的体外装配机制不同。

B. 其他的杆状病毒

对于其他的杆状病毒的粒子装配过程了解得很少。马铃薯 X 病毒属病毒（PapMV）和马铃薯 Y 病毒属病毒（TVMV）的装配都是在或接近 RNA 的 5′端起始（Sit *et al.*，1994；Wu and Shaw，1998）。体外 PapMV 装配起始所需的最小序列位于 5′端前 38～47 个核苷酸内（Sit *et al.*，1994），这一区域富含腺嘌呤和胞嘧啶，少有尿嘧啶残基，缺乏任何可辨别的二级结构。14S 外壳蛋白聚积体可能参与起始，该聚集体可能是一个每盘 9 个亚基的双盘结构，很可能是通过附加外壳蛋白的二聚体和三聚体在 5′→3′方向进行装配（Abouhaidar and Erickson，1985）。

马铃薯 Y 病毒属病毒的外壳蛋白亚基在特定的条件下也形成堆叠的环状结构（McDonald *et al.*，1976；Goodman *et al.*，1976），在加入 RNA 后会产生病毒状粒子，这种粒子比天然的病毒粒体短，且不具有侵染性（McDonald and Bancroft，1977）。在体内使用 RNA 酶保护实验（Wu and Shaw，1998）证实装配起点接近 RNA 的 5′端，实验表明 TVMV 接种原生质体后再培养 30～45 min 即开始装配。

马铃薯 Y 病毒属的外壳蛋白在大肠杆菌、酵母内表达以及由重组体痘苗病毒（vaccinia virus）介导在哺乳动物细胞内表达出来后就会装配成病毒状粒子（virus-like particle）（Jagadish *et al.*，1991；Hammond *et al.*，1998）。这就为研究参与病毒粒体装配的因素提供了一个新工具。例如，Jagadish 等（1993）用大肠杆菌表达研究表明

JGMV的Arg194和Asp238对于装配过程是必需的，但不一定参与形成所预测的盐桥(salt bridge)。

第Ⅴ节 等轴病毒的结构

A. 导言

通过晶体学研究，Crick和Watson推论小"球状"(spherical)病毒由相同的蛋白亚基构建的呈立体对称排列的蛋白质外壳组成，此种情况下蛋白亚基的数目可能是12的倍数。

Crick和Watson(1956)指出立体对称(cubic symmetry)很有可能导致形成等轴(径)的(isometric)病毒粒体。立体对称形式有三种：四面体(2∶3)对称、八面体(4∶3∶2)对称与二十面体的(icosahedral)(5∶3∶2)对称。因此，一个二十面体有五重、三重、两重旋转对称(twofold rotational symmetry)。对于一个病毒粒体而言，这三种立体对称可能包含着12个、24个、60个同样的亚基在球体表面以完全相同的方式排列。这些亚基可以是任何形状。

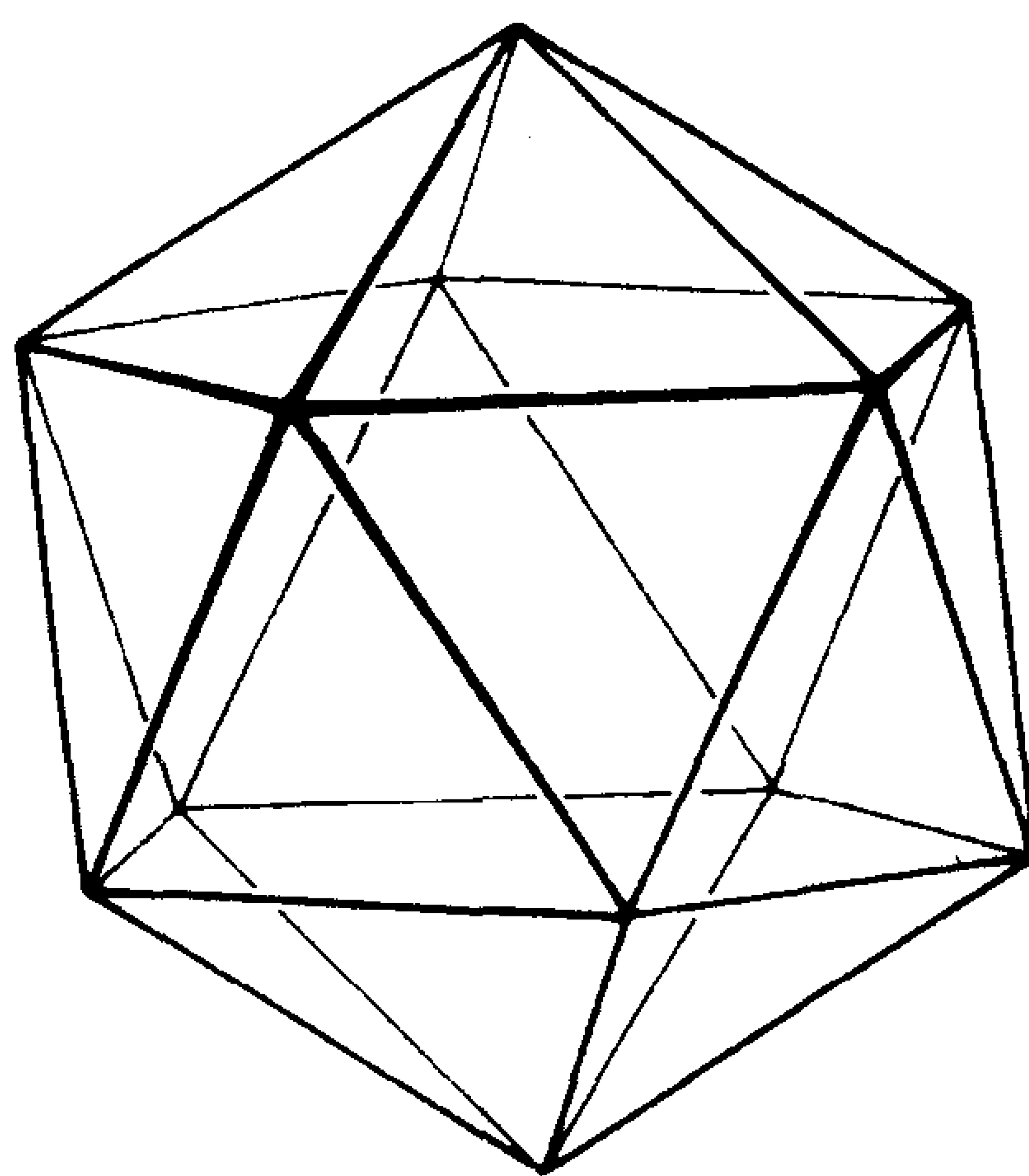


图5.16 规则的二十面体(regular icosahedron)。该立体具有五重旋转对称(fivefold rotational symmetry)的12个顶角(vertices)；每个三角面的中心位于三重对称轴上，每条边的中点位于二重对称轴上。共有20个相同的三角面。在每个面的相同位置可摆放任意形状的三个结构亚基，给出60个结构亚基的构型。一些最小的病毒具有60个亚基以这种方式排列的结构。

Klug和Caspar(1960)意识到很多病毒可能都有由二十面对称方式排列的亚基组成的外壳。Horne和Wildy(1961)探讨了5∶3∶2对称的二十面体外壳的蛋白亚基排列的可能的模型。他们考虑过5个和6个蛋白亚基簇的可能包装排列。Pawley(1962)列举了可能适合于多面体的平面聚合(plane group)，他指出这些也许能应用于病毒结构的研究。Caspar和Klug(1962)进一步发展了关于病毒特别是基于二十面体结构的等轴病毒的构造理论。一个由许多相同的小蛋白质分子组成的壳可以最有效地利用病毒的遗传材料。

图5.16显示了一个规则的二十面体(icosahedron)。在每个面上的相同位置有三个亚基，因此该二十面体共有60个相同的亚基。这是在一个等轴壳体上的所有相同位置所能布置的最大亚基。一些病毒具有这样的结构，但多数病毒具有更多的亚基，所以不是所有的亚基都处于相同的环境中。

B. 准等价

Caspar和Klug(1962)用他们的准等价(quasi-equivalence)理论为我们理解许多小型等轴病毒衣壳由60个以上相同亚基构建的方式提供了基础。概括地说，他们认为并不是在衣壳上的所有化学亚基都需要严格的数学等价方式排列，而只需要等价排列即

可。他们还推定，整个衣壳是由相同类型的键组织在一起的，但这些键在一些不同的非对称相关的环境中可能会以略微不同的方式发生变形。他们计算出所必需的变形程度应在物理学上可以接受。除了基本的结构（图 5.16）外，准等价可能在所有的二十面体病毒中都存在。基本上，五聚体（pentamer）产生三维弯曲（3-dimensional curvature），由 12 个五聚体产生一个紧密的二十面体，而六聚体（hexamer）产生二维弯曲（或管装结构）。因此，准等价在概念上的基础就是同一蛋白亚基可交替地形成六聚体和五聚体。

然而，最近的关于小病毒衣壳上亚基排列的详细信息已经改变了关于准等价的原有观点（Johnson and Speir，1997）。已鉴定出一系列往往涉及亚基多肽的 10～30 个残基片段的分子开关（molecular switch）。这种开关使得亚基多肽在某些界面表现出二十面体对称，而在相似的非对称等价的界面上则表现为无序。这种开关包括亚基多肽的特殊片段、单链或双链 RNA 和二价阳离子。如 TBSV 具有的多结构域亚基（multidomain subunit），该亚基通过有别于亚基间键的扭曲的一些方式（参见第Ⅵ节 B. 4. d），在很大程度上适应于在衣壳上不同的对称相关的位置。即使由 60 个相同亚基组成的粒子，如果这些亚基通过相互作用而能与基因组核酸结合，也可能在细微的结构方面存在一些变化（Chapman，1998）。

其他病毒在二十面体这个主题上已演化出了不同的变异。例如，豇豆花叶病毒属病毒（参见第Ⅵ节 B. 6. a）和呼肠病毒科的成员（参见第Ⅶ节）在其壳内不同的对称环境具有不同的多肽。杆菌状病毒粒体，如 AMV 和杆状 DNA 病毒属病毒，也是以二十面体对称为基的（参见第Ⅵ节 B. 2. a 和第Ⅵ节 B. 5）。

C. 可能的二十面体

Caspar 和 Klug（1962）列举了所有可能的二十面体表面的网格（lattice）和所涉及的结构亚基数目。带有 20 ×3＝60 个结构亚基的基本二十面体（图 5.16），可以按照下列公式进行亚三角形剖分。

$$T = P(f^2)$$

式中，T 为三角形剖分数（triangulation number）。

1. 参数 f 的含义

基本三角面可以被连接每个边上均等间隔的线再分割（示意图 i）。因此，f 是每个

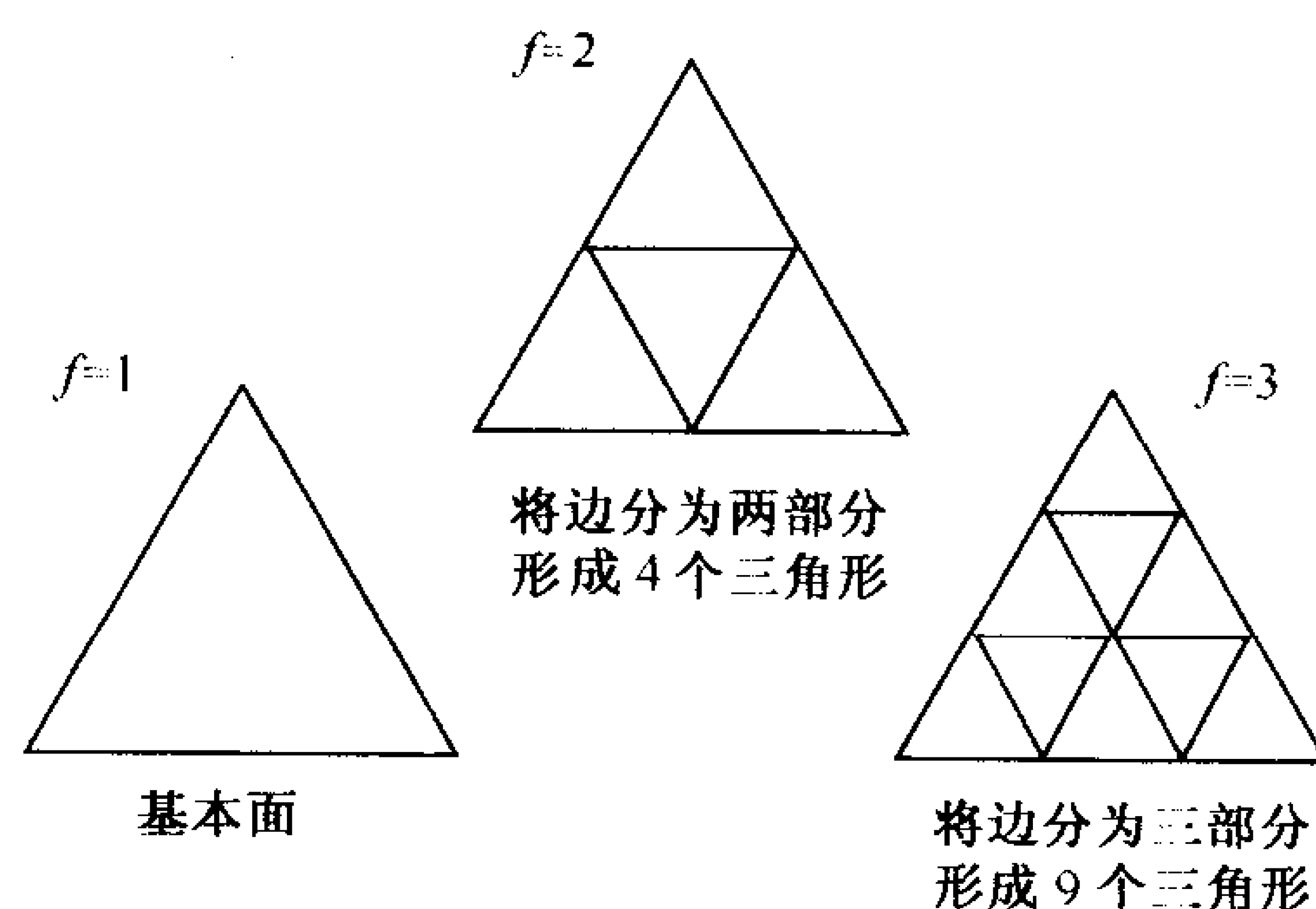


示意图 i

边的亚分割数，而 f^2 为所形成的小三角形数。

2. 参数 P 的含义

另一种进行亚三角形剖分的方式由 P 表示。它可以简单地设想为等边三角形构成的一个平面网（示意图 ii）。

这样一张薄片可以通过从一个六角形中剪掉一个三角形（如阴影部分），连接所裁剪的边即形成一个具有五重旋转对称的顶点，经折叠可形成一个基本的二十面体。

然而，如果每个顶点被一条不经过最近的顶点的线所连接，将会得到这个面的其他的三角剖分。在这个最简单的例子中，这些“非紧邻的”顶点被连接起来（示意图 iii）。这就提供了一种等边三角形的新的排列方式。该平面网（plane net）通过从每个原来的顶点中去除一个三角形（如示意图 iii 中有阴影的三角形），即可折叠成图 5.17C 的实体，然后折叠产生一个具有五重对称的顶点。

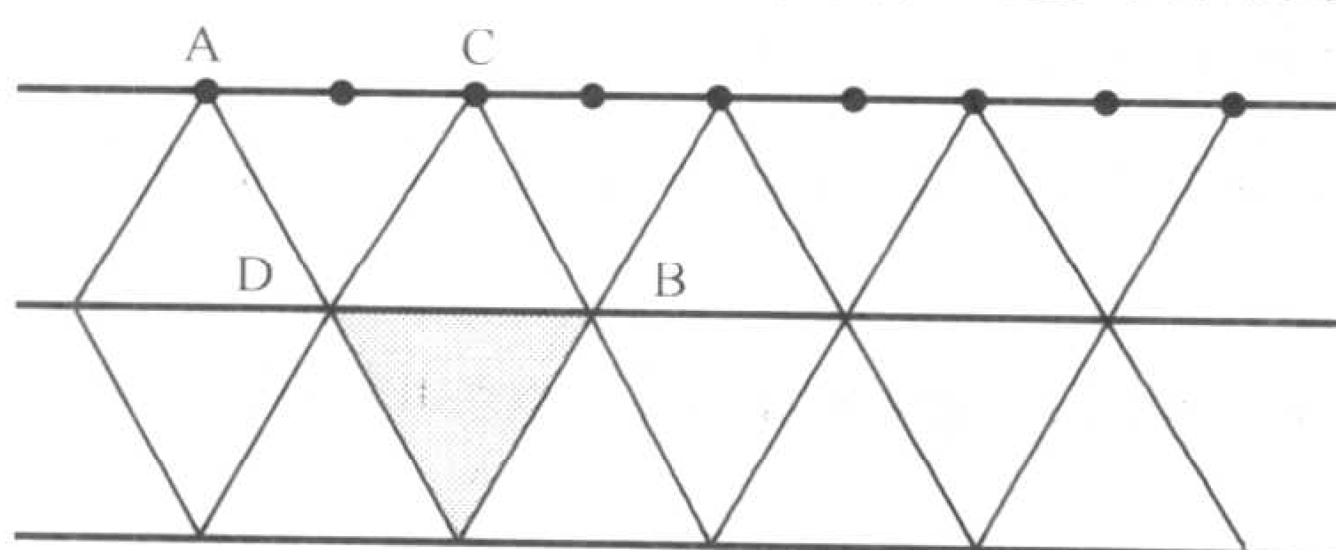


示意图 ii

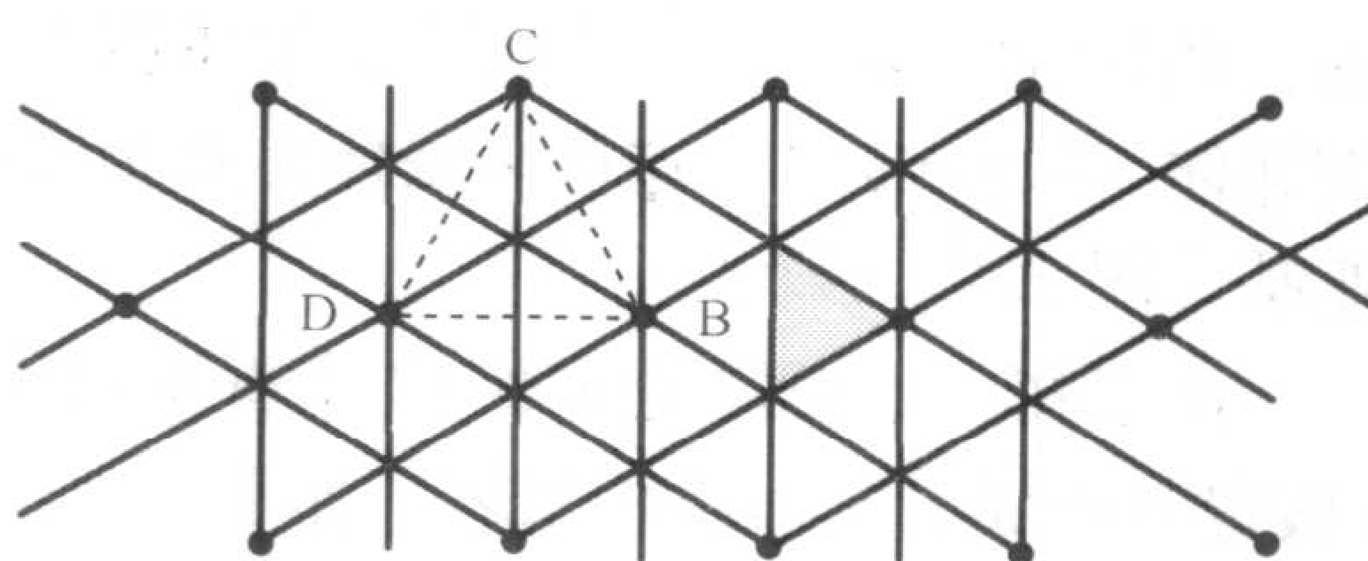


示意图 iii

应用简单的三角学知识可看出，每个小三角形都为原来面的面积的 1/3。因为通过观察即可知在原来的面（虚线 C-B-D）上分成了 6 个新的半三角形。在这个例子里 $P = 3$。通常

$$P = h^2 + hk + k^2$$

式中，h 和 k 为没有公因数（common factor）的任意整数。

例如，$h = 1$ 且 $k = 0$ 时，$P = 1$；

例如，$h = 1$ 且 $k = 1$ 时，$P = 3$；

例如，$h = 2$ 且 $k = 1$ 时，$P = 7$。

其中如果 $P \geqslant 7$ 则二十面体是偏斜的（skew），左手和右手的形式都有可能。在一个病毒中 h 和 k 的物理意义将在下面介绍。

因为每一个由参数 P 形成的三角形可以进一步再分割成 f^2 个小三角形，T 给出原来的面再分割的总数，$20T$ 为三角形的总数。图 5.17 列出了一些例子。

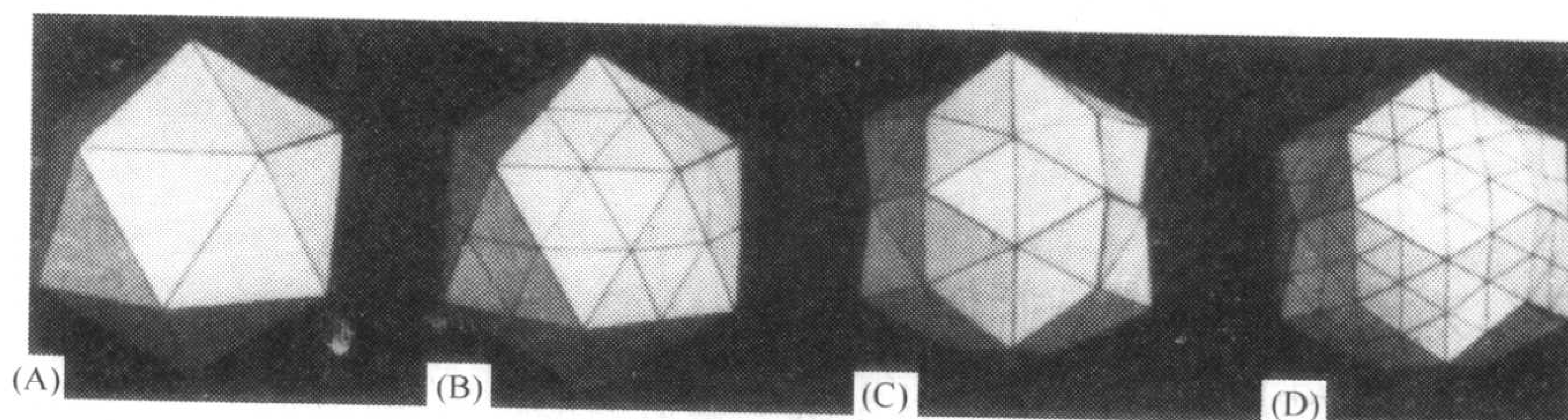


图 5.17　在图 5.16 中所示的基本二十面体亚三角剖分产生一系列构成二十面体对称的三角面（icosadeltahedra）的方式。(A) 基本二十面体，$T = 1$（$P = 1$，$f = 1$）。(B) $T = 4$（$P = 1$，$f = 2$）。(C) $T = 3$（$P = 3$，$f = 1$）。(D) $T = 12$（$P = 3$，$f = 2$）。经允许，引自 Caspar 和 Klug (1962)。

因此，一个二十面体衣壳的结构亚基的数目 $= 20 \times 3 \times T = 60T$。

D. 亚基的聚集

病毒表面的真实的细微结构将取决于这些实际的亚基是如何包裹在一起的。例如，对于基本的二十面体就有三种可能的亚基聚集方式，如示意图 iv 所示。

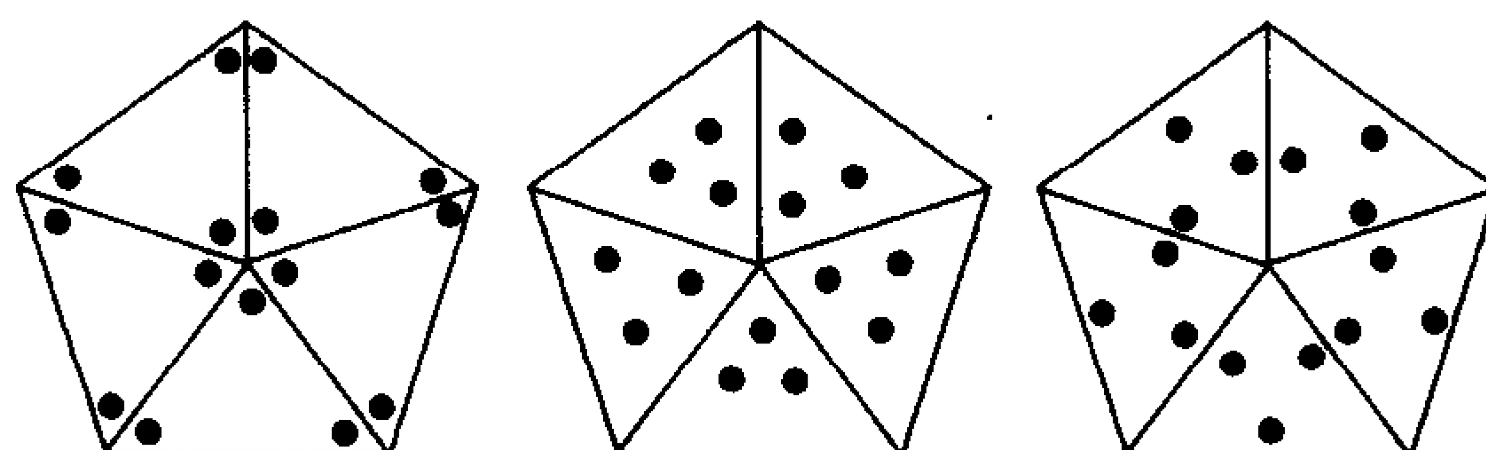


示意图 iv

事实上，很多较小的植物病毒是以 $P = 3$、$f = 1$、$T = 3$ 的二十面体为基础构建的。在这种结构中，结构亚基通常在顶点周围聚集成亚基的五聚邻体（pentamer）和六聚邻体（hexamer）。这些多聚体是在负染的病毒粒体电子显微图片中可观察到的形态亚基［图 5.30（B）］

由于在二十面体里总有 12 个五重对称的顶点，我们可以计算形态亚基的数目（M）（假定其形成五聚体和六聚体）如下：

$$M = [(60T - 60)/6] \text{六聚体} + (60/5) \text{五聚体}$$
$$= 10(T - 1) \text{六聚体} + 12 \text{五聚体}$$

在病毒粒体的照片中，可以清楚地识别这些五聚体和六聚体（如负染的病毒粒体的一个侧面图像或更大的病毒的外表面冷冻断裂复型），参数 h 和 k 可用于确定粒子的二十面体种类。这一程序对于含有大量六聚体的壳体十分有用。h 和 k 代表以最短路线横越两个相邻五聚体的六聚体数目。因此，我们必须鉴定两个相邻的五聚体。例如，示意图 v 中表现的结构可以在噬菌体 λ 的冷冻蚀刻复型的表面观察到（Bayer and Bocharov，1973）。这显示了一个具有右手偏斜的变形二十面体。

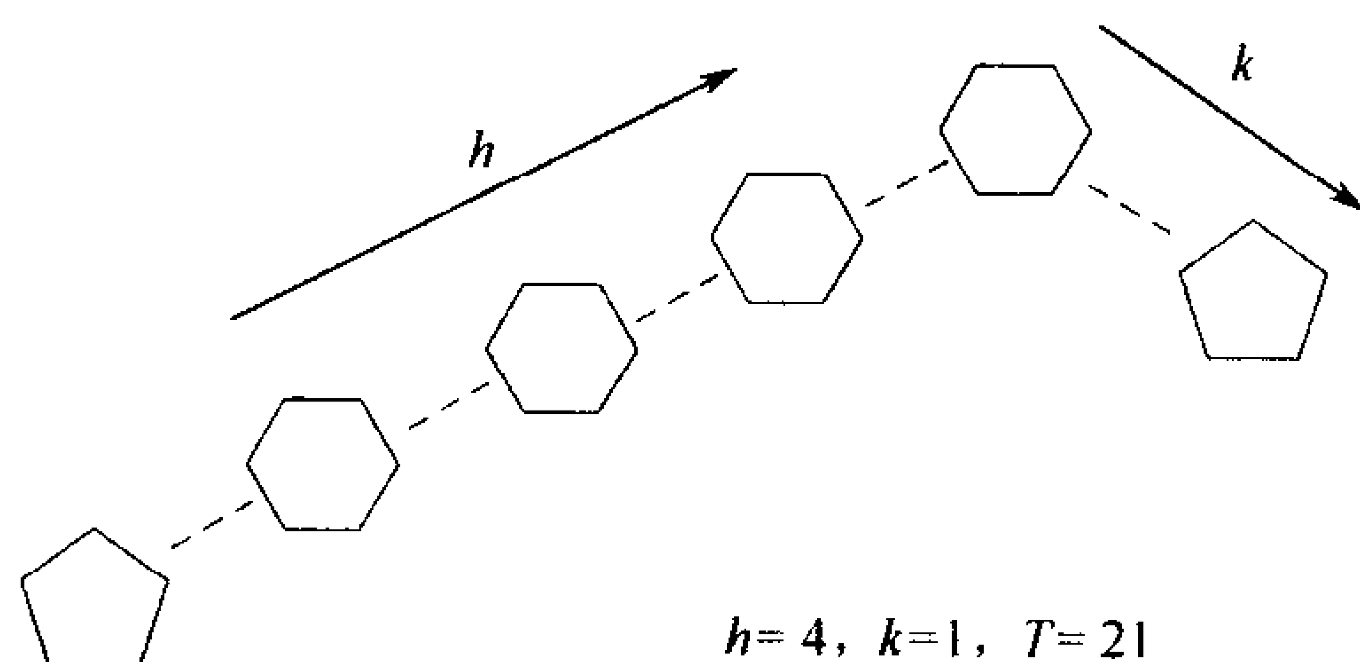


示意图 v

E. “真”对称和“准”对称

在基本的二十面体中（图 5.16）位于沿三角形面的任意边中间的一个特征定位于整个立体的一个旋转轴上。因此，它位于一个“真的”或二十面体对称的轴上。这是一个真正的二重对称（dyad）。在任何更复杂的二十面体（$T > 1$）中，存在一种以上的二重对称。例如，在一个 $P = 3$、$T = 3$ 的壳中［图 5.17（C）］，在 60 个三角形面的

每一个面的一条边的中间点位于相对于整个立体的真正二重对称轴上。一个面另外两条边的中间位置只有局部的二重对称，因此这种对称就称作"准"二重对称（"quasi" dyad）。

在"准"对称的 3 重轴上，三个化学组成相同但结构独立的亚基在一个二十面的非对称单位内分别称为 A、B、C (Harrison *et al.*，1978)（图 5.18）。

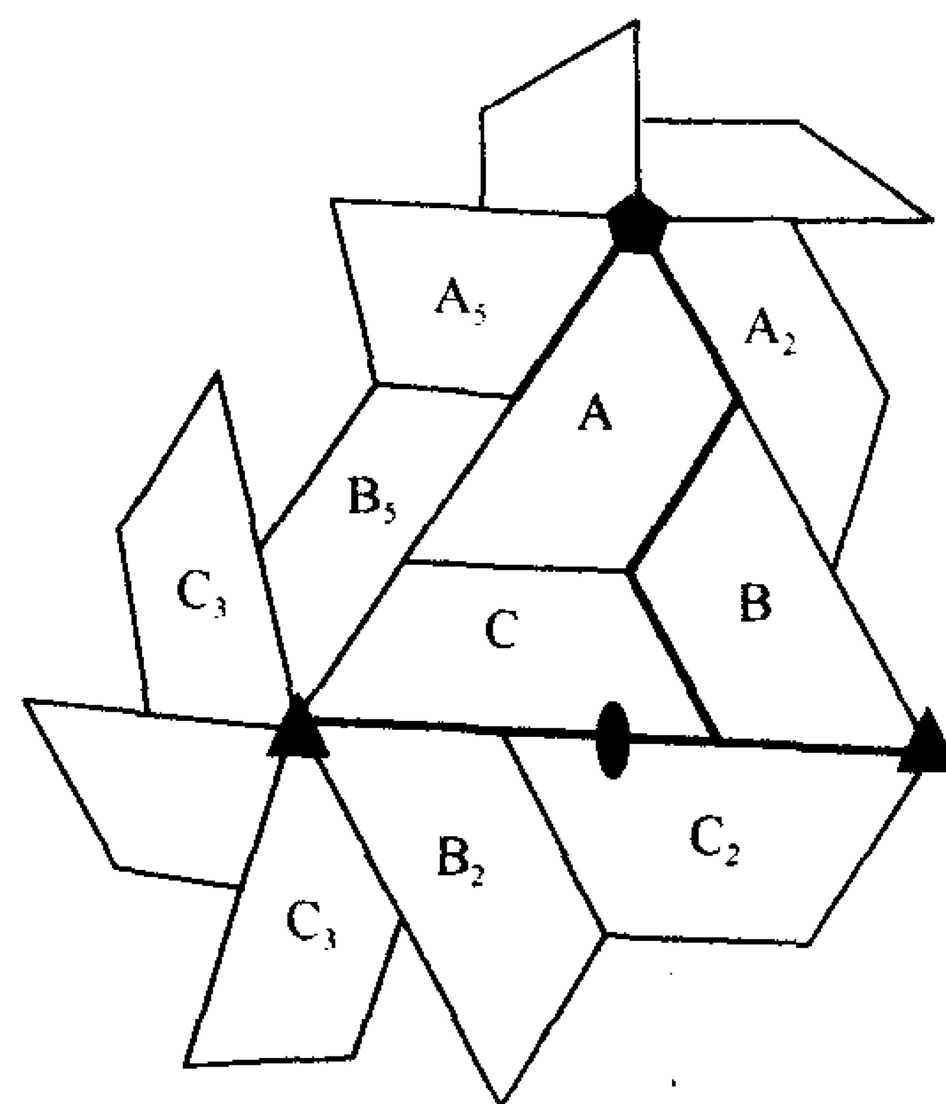


图 5.18 已发现的几种 $T=3$ 的植物和动物病毒蛋白亚基的排列方式。化学结构相同的亚基的命名遵循 Harrison 等（1978）。经允许，引自 Krishna 等（1999）。

F. 杆菌状粒子

一些病毒粒体，如 AMV 和杆状 DNA 病毒属病毒，是带有由管状切面分割的圆形末端的杆菌状。Hull (1976a) 提出这些粒子的结构是以二十面体对称为基础的。圆形的末端受二十面体约束着，12 个五聚体（每个末端有 6 个）决定圆形末端的三维曲率。管状切面的二维结构由六聚体组成。Hull 推导出横切过二十面体的两重、三重、五重和居间点阵轴（interlattice axes）的各种六聚体结构。

第Ⅵ节 小二十面体病毒

A. 亚基的结构

许多小二十面体病毒外壳蛋白亚基的分子质量大小为 20～40 kDa，有一些更大，但是折叠成在此大小范围内有效的"假分子"（pseudomolecule）（参见第Ⅵ节 B. 6）。与杆状病毒相反，大部分小二十面体病毒的亚基结构有相对较高比例的 β 片层和较低比例的 α 螺旋（Denloye *et al.*，1978；Odumosu *et al.*，1981），而且具有相同的基本结构。该结构包含有八股反向平行的 β 夹心结构，通常称为 β 桶或胶冻卷（jellyroll），其示意图见图 5.19。

亚基总体形状呈三维楔形，B-C、H-I、D-E 和 F-G 转角（turn）存在于狭窄（内部）端。亚基大小的多数变异发生在 N 端和 C 端，以及发生在亚基的宽端的 β 折叠链之间。

β 桶元件和 N 端、C 端元件的精确定位可以获得柔性以克服准等价问题。在下面的详细结构描述中阐明了这一点。

外壳蛋白亚基可形成一个、两个或三个结构域，即 S（壳）结构域、R（随机结合）结构域和 P（凸出）结构域；所有的病毒都有 S 结构域。R 结构域有些用词不当但是可用于定义与病毒 RNA 相联系的多肽链的 N 端区域。因为它是随机的，所以不能用 X 射线晶体学来确定其结构。P 结构域可在某些病毒的表面形成突起。

B. 病毒粒体的结构

现在我们能够辨别出 7 种小二十面体或以小二十面体为基础的植物病毒的蛋白衣壳的结构，它们的构造已经过详细研究，其中包括 $T=1$ 的粒子、基于 $T=1$ 的杆菌状粒

子、基于 $T=1$ 的双生粒子、$T=3$ 粒子、基于 $T=3$ 的杆菌状粒子、假 $T=3$ 的粒子以及 $T=7$ 的粒子。

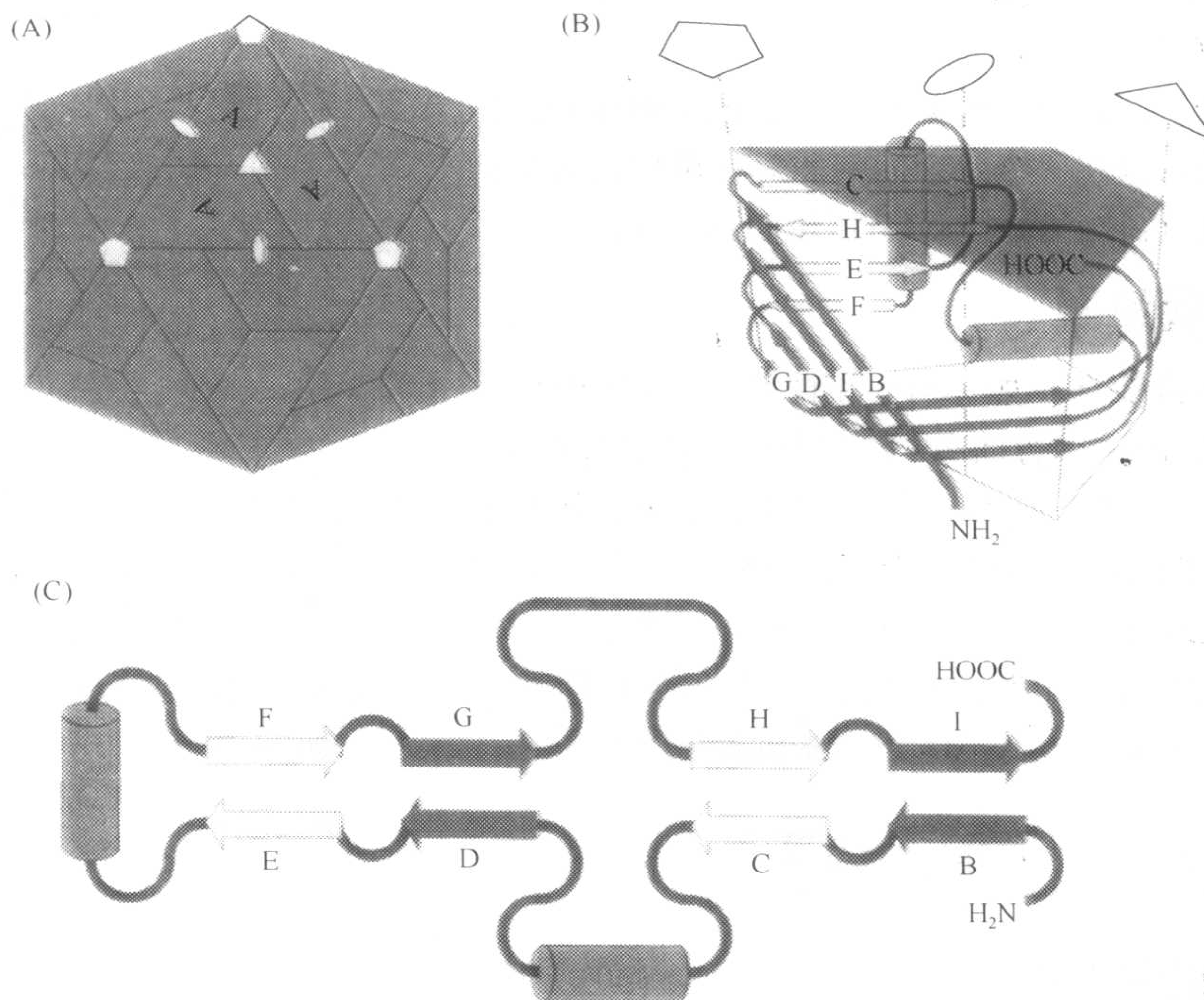


图 5.19 （见彩色图版 5.1）(A) 二十面体衣壳含有 60 个相同的蛋白亚基拷贝——蓝色标记为 A。这些亚基通过五重对称（顶角处黄色五角形）、三重对称（三角面内黄色三角形）和二重对称（边缘的黄色椭圆形）相关联。对于给定大小的亚基，这种点聚合对称生成最大可能的装配（60 个亚基），其中每一蛋白质处于同样的环境内。(B) 存在于许多 RNA 和某些 DNA 病毒结构中的亚基结构单元的示意图。这种亚基具有互补的接触面，当这些接触面重复地互作则导致二十面体的对称。亚基的第三个结构是一个具有胶冻卷（jellyroll）状拓扑结构的 8 链 β 桶——见 (C) 部分。在此示意图内，β 链和螺旋的编码与图 (C) 中的一样。亚基大小范围通常为 20～40 kDa，不同病毒之间的差异发生于 N 端和 C 端以及 β 折叠层之间插入片段的大小。这些插入一般不发生在楔形的狭窄端（B-C、H-I、D-E 和 F-G 转角）。(C) 病毒 β 桶拓扑学显示 β 折叠链之间的连接（由黄色或红色箭头表示）以及 β 折叠链间的插入部分的位置。绿圆筒代表通常保守的螺旋。C-D、E-F 和 G-H 之间的三个环经常含有大的插入片段。经允许，引自 Johnson 和 Spier (1999)。

1. $T=1$ 的粒子（卫星病毒）

卫星病毒是已知最小的植物病毒，直径约为 17 nm，衣壳由 17～21 kDa 的多肽组成（参见第 14 章第Ⅱ节 A，卫星病毒）。

烟草坏死卫星病毒（STNV）的结构是最先确定的，它由 60 个 21.3 kDa 蛋白亚基排列成 $T=1$ 的小二十面体的表面结构。蛋白亚基的结构已在晶体结构分析方面精确到 2.5 Å 水平（Jones and Liljàs，1984）。多肽链的一般拓扑结构类似于 TBSV 和 SBMV 的 S 结构域 [图 5.20 (C)]，但在 $T=1$ 的二十面体结构中亚基的包装明显不同（Rossmann *et al.*，1983），即不存在 P 结构域。

在 STNV 的氨基末端，埋藏在 RNA 里的规则螺旋结构（12～22 个残基）之前只有 11 个不规则的氨基酸残基。并存在三种不同的金属离子（可能有 Ca^{2+}）结合位点。这些位点可以将蛋白亚基连接在一起。Montelius 等（1988）提出了蛋白衣壳的一种更

详细的结构。

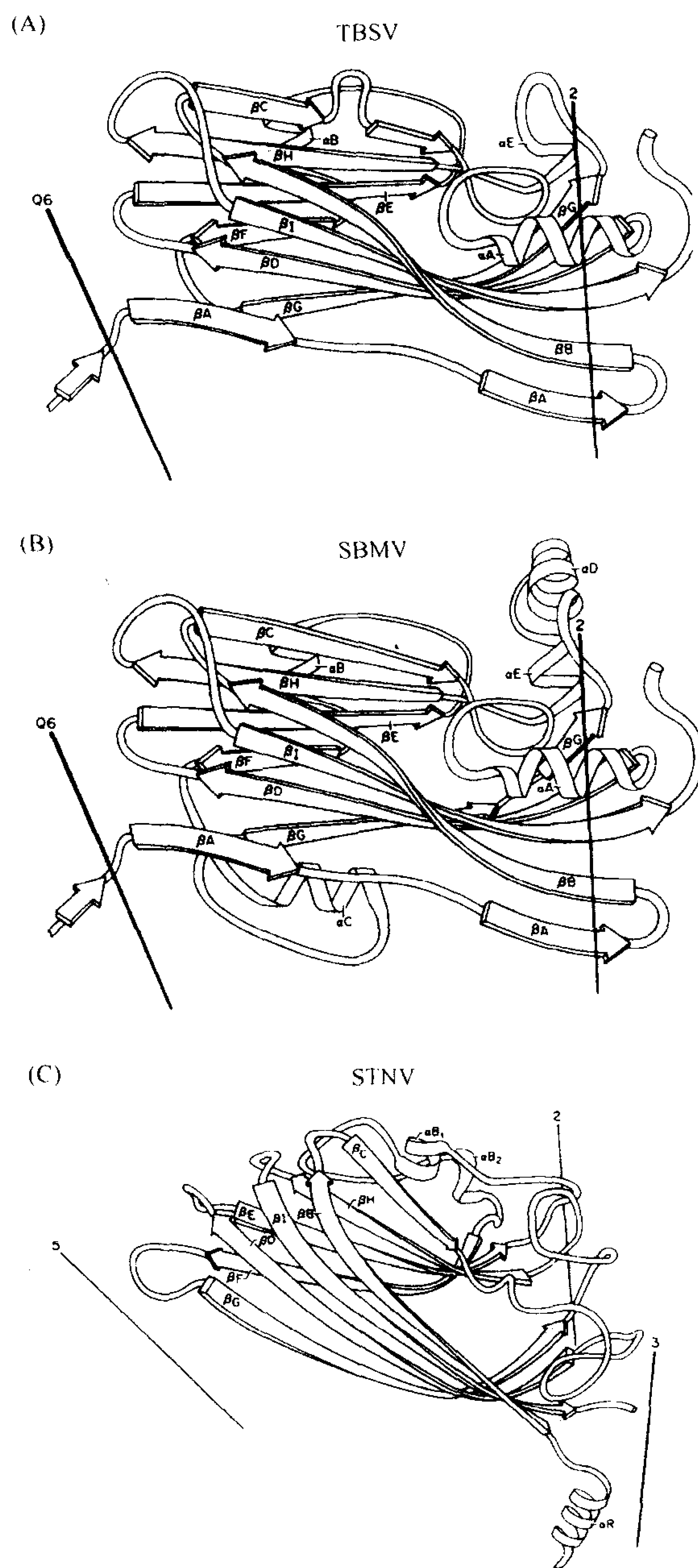


图 5.20　外壳蛋白骨架折叠示意图。(A) TBSV、(B) SBMV 和 (C) STNV，均以大致可比较的方向显示。经允许，引自 Rossmann 等 (1983)。

人们用 16 Å 分辨率的中子衍射的方法研究了在 H_2O/D_2O 中 STNV 的晶体结构 (Bentley *et al.*，1987)。在 40% D_2O 的条件下，散射主要来自 RNA 成分。图 5.21 展示了两种主要的 RNA 模体 (motif)。

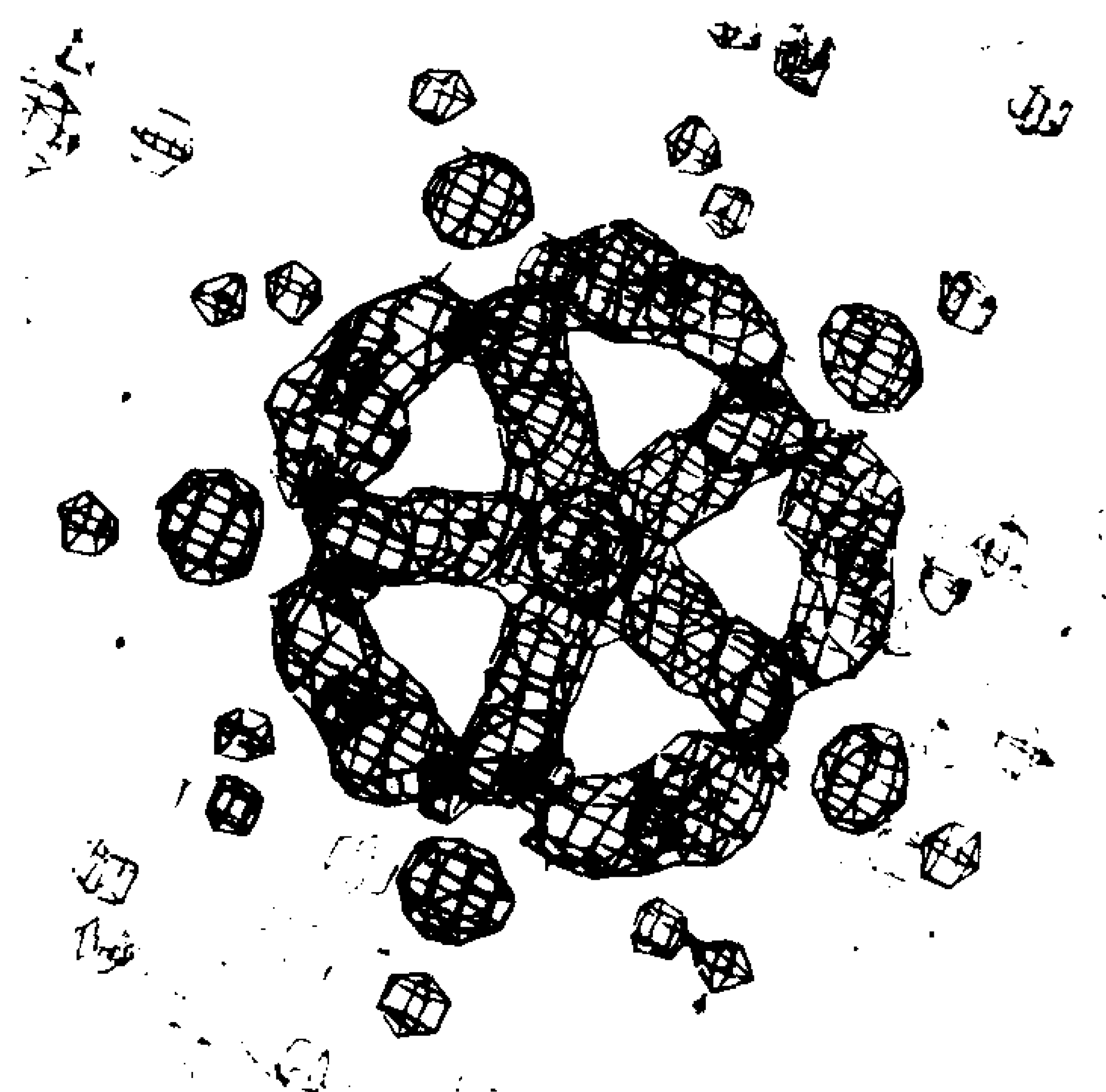


图 5.21 由中子衍射（neutron diffraction）法确定的 STNV 内 RNA 的低分辨率结构。在 40% 的 D_2O 正密度（positive density）中俯视病毒中心五重轴。Ⅰ是 RNA 的密度模体，沿着三角形的边存在并形成一个二十面体的边缘。它的长度约 45 Å，直径为 22～25 Å。RNA 的密度模体Ⅱ沿着每个五重轴在距病毒中心 67 Å 处存在。较小的区域——密度模体Ⅲ处于较高半径、对应于蛋白质密度的实际起伏。经允许，引自 Bentley 等（1987）。

实际上这些是由 RNA 较弱的密度区相连的。每个球形的模体（Ⅱ）是由 5 个对称相关的延伸结构（Ⅰ）连接而成的。它们在蛋白外壳的内表面形成了一个连续的 RNA 密度结构网。模体Ⅰ形成二十面体的边缘，并留下了围绕着三重轴的三角形孔洞。蛋白亚基氨基端的三股螺旋状臂就是从这些洞穿透过去，并且与 RNA 形成紧密的接触。碱性的氨基酸的位置更利于与 RNA 的接触。

除了这种蛋白质与 RNA 之间的接触面外，蛋白外壳的内表面与 RNA 之间通过一层很薄的溶液分开。模体Ⅰ的横切面与其代表 RNA 中的双螺旋的观点很符合。如果是这种情况，那么 RNA 的 72%可能为双螺旋结构。STNV 的 RNA 具有与转运 RNA 类似的热变性动力学表明其具有较高程度的二级结构的事实证实了这一点（Mossop and Francki，1979a）。

另外，两种卫星病毒 STMV 和 SPMV 的结构也已经得到解析（Larson *et al.*，1993a，b；Ban 和 McPherson，1995），并与 STNV 的结构进行了比较（Ban *et al.*，1995）。尽管所有在狭窄端五重轴接触的亚单位都有 β 折叠筒状结构，但这 3 种病毒的二级结构元件的排列存在着明显的差异。而且，STNV 的五重轴上蛋白质的互作由 Ca^{2+} 调节，STMV 则由阴离子调节，而 SPMV 明显地都不属于这两种情况。最后，STMV 的核酸只有在电子密度图中可见，并表明双股螺旋 RNA 片段与每个外壳蛋白二聚体联结。

2. 基于 $T=1$ 对称的杆菌状粒子

在第Ⅴ节 F 中曾提到杆菌状病毒粒体是基于二十面体的对称结构。

a. 苜蓿花叶病毒属（*Alfamovirus*）和等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）

提纯的 AMV 大多数都含有 4 种核蛋白组分（底端，B；中部，M；顶端 b，Tb；顶端 a，Ta）。每种都包含确定长度种类的 RNA。基因组分布于 Tb、M 和 B 组分上。4 个主要组分中的 3 个为直径是 19 nm 的杆菌状粒子。第四个组分（Ta）一般为直径略

大于 19 nm 的近球体（图 5.22）。

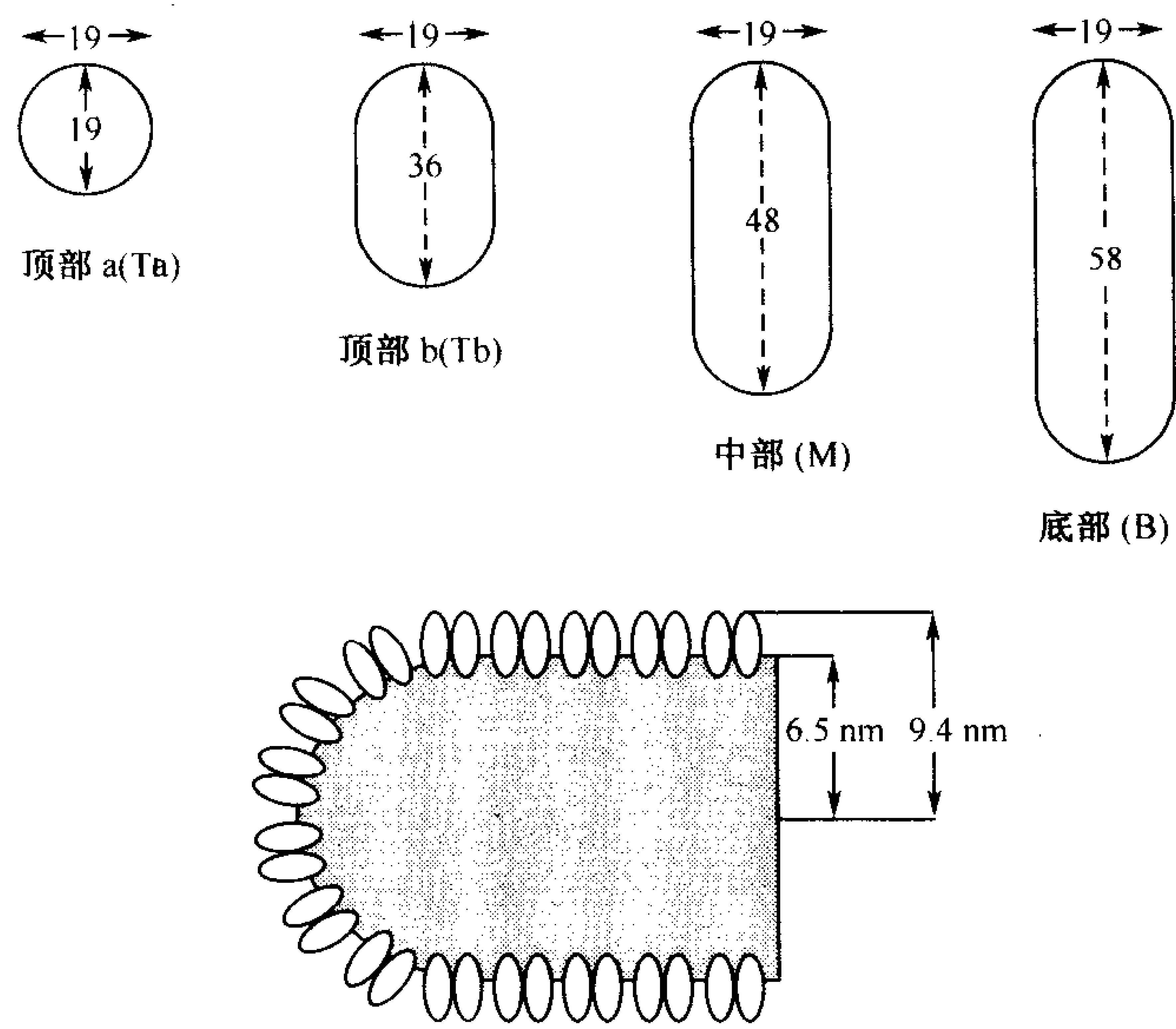


图 5.22　AMV 粒子。上部：4 种主要类型粒子的大小（nm）。下部：蛋白质和 RNA 在 AMV 底部组分的分布示意图。RNA 由灰度部分表示，蛋白质由类椭圆体（ellipsoid）表示。该模型通过对 30S 和底部组分的小角度中子散射分析推导而来。经允许，底部图来自 Cusack 等（1981）。

然而，研究人员发现 Ta 组分存在两种形式（Heijtink and Jaspars，1976）。Ta^{t}近球形，可溶于 0.3 mol/L $MgSO_4$。Ta^{b}为小棒状结构，不溶于 0.3 mol/L $MgSO_4$。这两部分的其他性质表现一致。Ta 组分含有 120 个蛋白亚基，因此，Cusack 等（1983）推测这些组分可能为非二十面体结构。

Heijtink 等（1977）通过仔细研究 RNA、蛋白亚基和病毒粒体的分子质量得出结

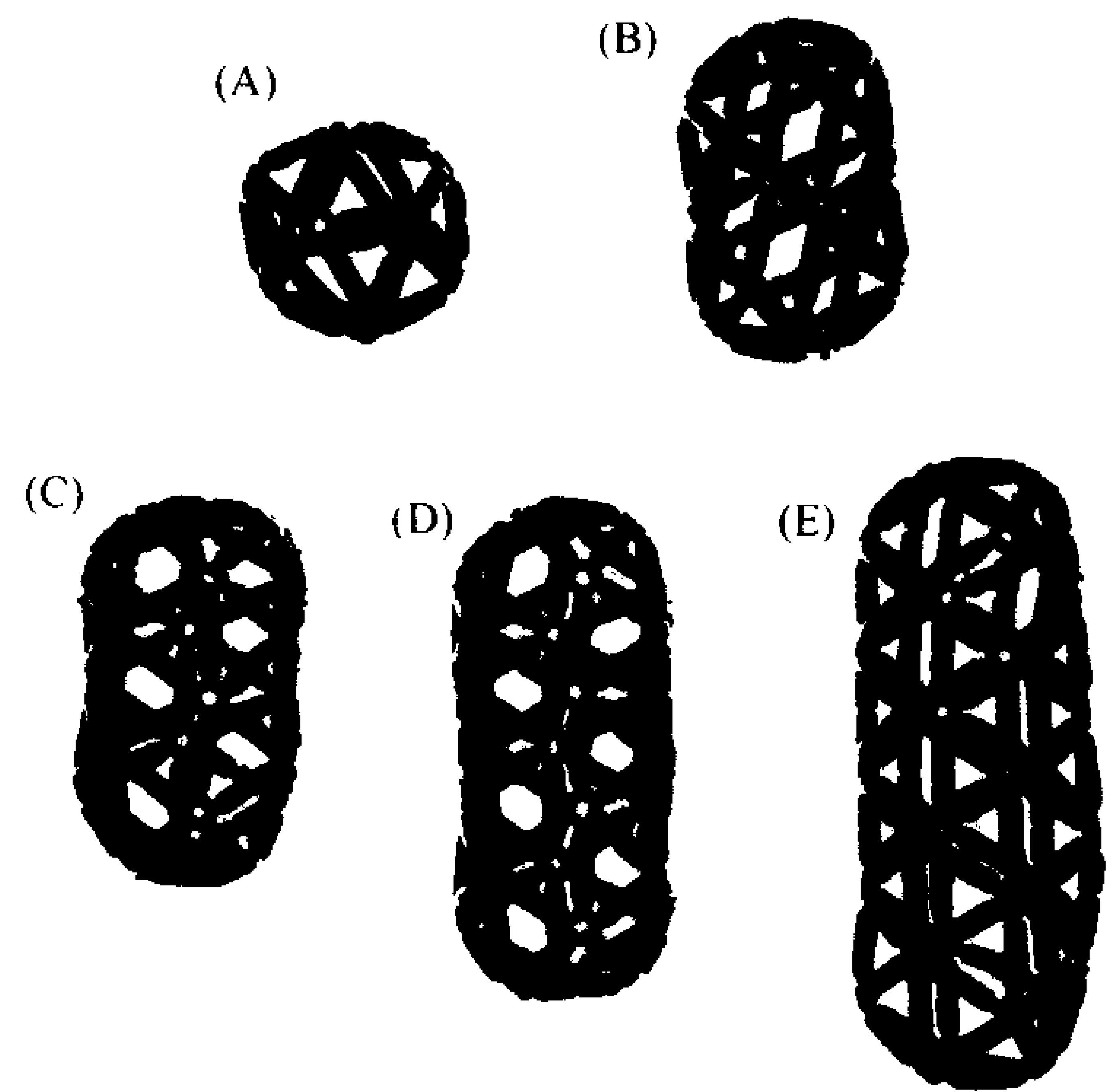


图 5.23　Geodestix 模型显示 AMV 各个组分的结构。（A）Top_z（53S）组分；（B）top_a组分；（C）top_b组分；（D）中间组分；（E）底部组分。经允许，引自 Hull 等（1969）。

论：4 个主要组分中的外壳蛋白单体的数目等于 60 ＋（$n\times 18$），n 为 10、7、5 或 4。

如上（参见第Ⅴ节 F 中）所述，已经指出这种粒子结构基于二十面体，六聚体组成的管状组分对称环绕在各轴两侧。Hull 等（1969）利用光衍射在电镜下观察负染的 AMV 粒子，推测杆菌状粒子的管状结构是基于 $T=1$ 的二十面体，3 个六聚体（18 个外壳蛋白单体）环沿 3 重轴方向形成管状结构（图 5.23）。

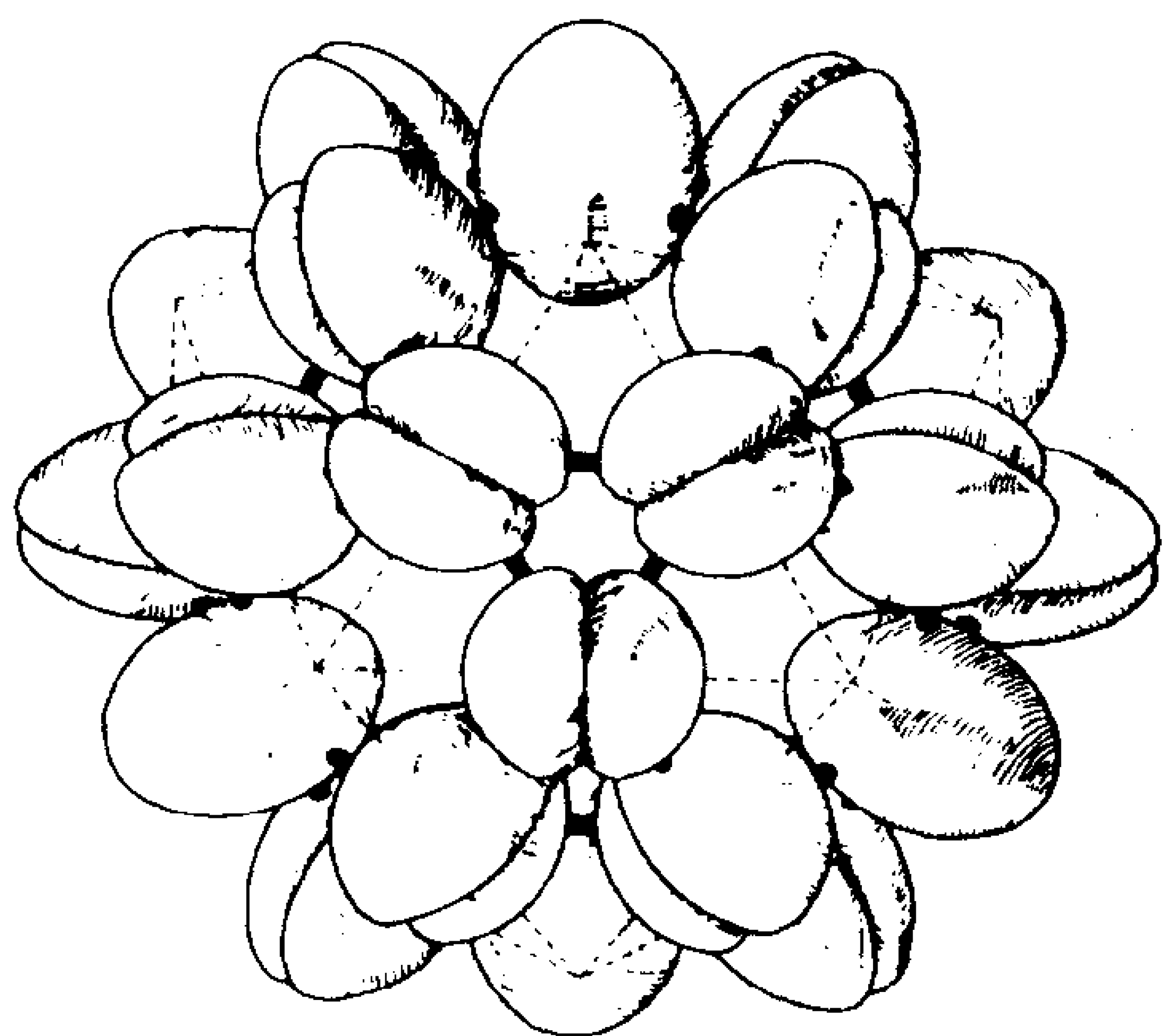


图 5.24　由 30 个外壳蛋白二聚体（dimer）构成的 30S AMV 粒子的 $T=1$ 结构。二聚体的二重对称轴与二十面体的二分体（dyad）位置一致，在五重和三重对称位置留有大的孔洞。为了简洁，省略了模型背面的亚基。经允许，引自 Driedonks 等（1977）。

利用质子磁共振（proton magnetic resonance）研究得到一个低分辨率的模型，在此模型中外壳蛋白由刚性的核心和柔性的（约 36 个氨基酸残基的）氨基末端组成（Kan *et al.*，1982）。蛋白质表现为溶于水的二聚体，两个分子间的疏水互作（hydrophobic interaction）使其保持稳定。这种二聚体是构成病毒衣壳的形态单位。

在适当的离子强度、离子种类、pH、温度和蛋白质浓度条件下，30 个二聚体可以形成一个 $T=1$ 的二十面体结构（图 5.24）（Driedonks *et al.*，1977）。该结构已经用 X 射线晶体分析在 4.5 Å 分辨率水平得到证实（Fukuyama *et al.*，1983），并且用冷冻电子显微术和图像重建技术可以进一步将其精确到 4.0 Å 水平（Kumar *et al.*，1997）。这表明该亚基结构和二聚体联合在结构上与 CCMV 相似。五聚体轴上的可见的大孔形成多孔的粒子结构。

此病毒粒体在高离子强度和 SDS 存在的条件下不稳定，对 RNA 酶敏感，这可能是因为在蛋白外壳上有孔洞的原因。在略碱性 pH 的条件下会发生构象的改变（Verhagen *et al.*，1976）。AMV 核蛋白在高盐条件下容易发生蛋白质和 RNA 的解离，而且杆菌状粒子可以在适当的条件下重新形成。因而，病毒主要是通过蛋白质和 RNA 的相互作用维持稳定（van Vloten-Doting and Jaspars，1977）。在很宽范围的溶液条件下，AMV 粒子不会表现出以后将介绍的雀麦花叶病毒属病毒的膨胀现象（Oostergetel *et al.*，1981）。与小等轴病毒相比，AMV 被认为处于永久性的膨胀状态，这类似于 CMV。

一些 AMV 株系的提纯物可用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离出至少 17 个核蛋白组分（Bol and Lak-Kaashoek，1974）。这些组分全都由单一病毒外壳蛋白构成（van Beynum *et al.*，1977）。除了主要的 4 种 RNA 外，至少存在 10 种较小的不同长度的 RNA。在大小上有些差异的粒子可能含有相同大小的 RNA，而相同大小的粒子有可能含有不同大小的 RNA（Bol and Lak-Kaashoek，1974）。AMV 在氯化铯（CsCl）梯度中不稳定，但是在硫酸铯（Cs_2SO_4）和三碘苯甲酰氨基葡萄糖（metrizamide）等密度梯度中稳定，并且可形成条带（Hull，1976b）。在这些梯度内，AMV 会在很接近的密度中形成两条带，主带主要含有底部组分，次带主要含有其他组分。这表明各组分很相似，但是蛋白质与 RNA 的比例不同。

一些 AMV 株系，如 15/64 和 VRU，形成罕见的长粒子可长达 1 μm（图 5.25）（Heijtink and Jaspars，1974；Hull，1970a）；这些粒子不含有任何异常的长 RNA 分子，而很有可能含有基因组片段的若干分子。

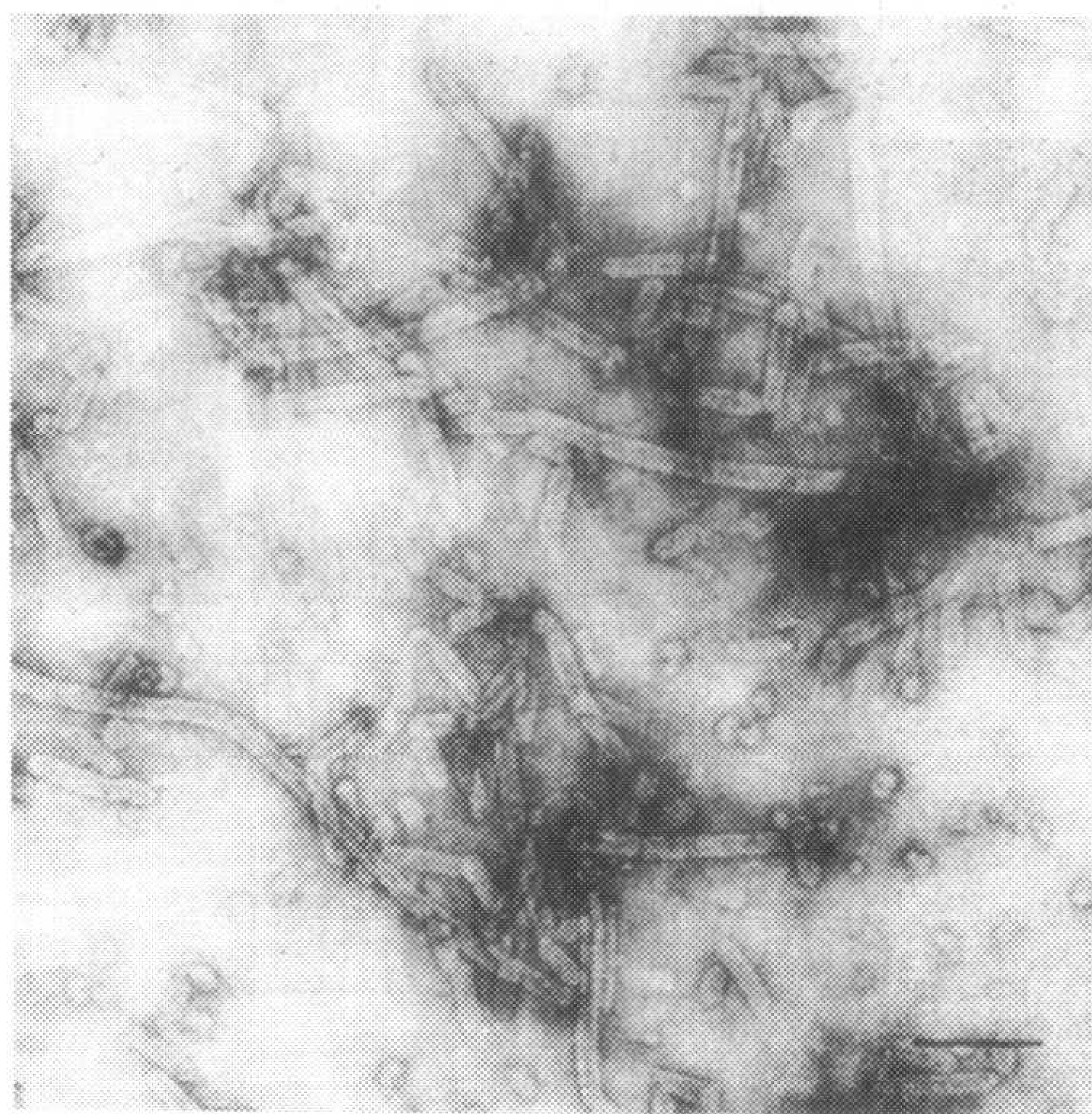


图 5.25 未经分级（部）分离的 AMV 的 VRU 株系制备物经醋酸双氧铀负染的电子显微照片，标尺＝100 nm。经允许，引自 Hull（1970a）。

重建实验表明形成长粒子的趋势是由外壳蛋白引导的（Hull，1970a）。以正常长度粒子株系的外壳蛋白与那些长粒子株系比较，Thole 等（1998）证明 Ser66、Leu175 两个氨基酸的置换与长粒子有关。当正常长度粒子的株系中的这两个氨基酸发生置换则会形成长的粒子。

等轴不稳环斑病毒属病毒（ilarviruses），如烟草线条病毒（TSV），含有准等轴或偶尔为杆菌状的 4 个大小不同的粒子（van Vloten-Doting，1975），这表现出与 AMV 群组有许多共同的特性（van Vloten-Doting，1976）。TSV 的上部组分可结晶成为一个六边形体，但是由于这些晶体很杂乱，因此不能用 X 射线衍射进行分析（Senke and Johnson，1993）。

b. 欧尔密病毒属病毒

欧尔密病毒属（*Ourmiavirus*）的病毒具有直径为 18 nm 的杆菌状粒子，并有 30 nm、37 nm 和 45.5 nm 三种长度（Lisa *et al.*，1988）。蛋白亚基聚集成二聚体或三聚体。突出末端可能由二十面体穿过三重轴的二聚体或二重轴的三聚体形成。管状体不形成类似 AMV 那样连续的几何网状结构，而形成不连续的，在两双层蛋白质盘状结构之间存在裂缝（图 5.26）。已观察到由 2、3、4 个或 6 个双层盘结构构成的粒子，由 4 个或 6 个构成的比较罕见。图 5.26（B）b 显示了这种结构的示意图。

3. 基于 $T=1$ 对称结构的其他病毒粒体（双生病毒）

双生病毒含有单链 DNA 和一种外壳蛋白。提纯制剂中的粒子由成对的或双生的二十面体组成（图 5.27）。

通过研究负染的粒子和可能的结构模型，Francki 等（1980b）提出 CSMV 由两个

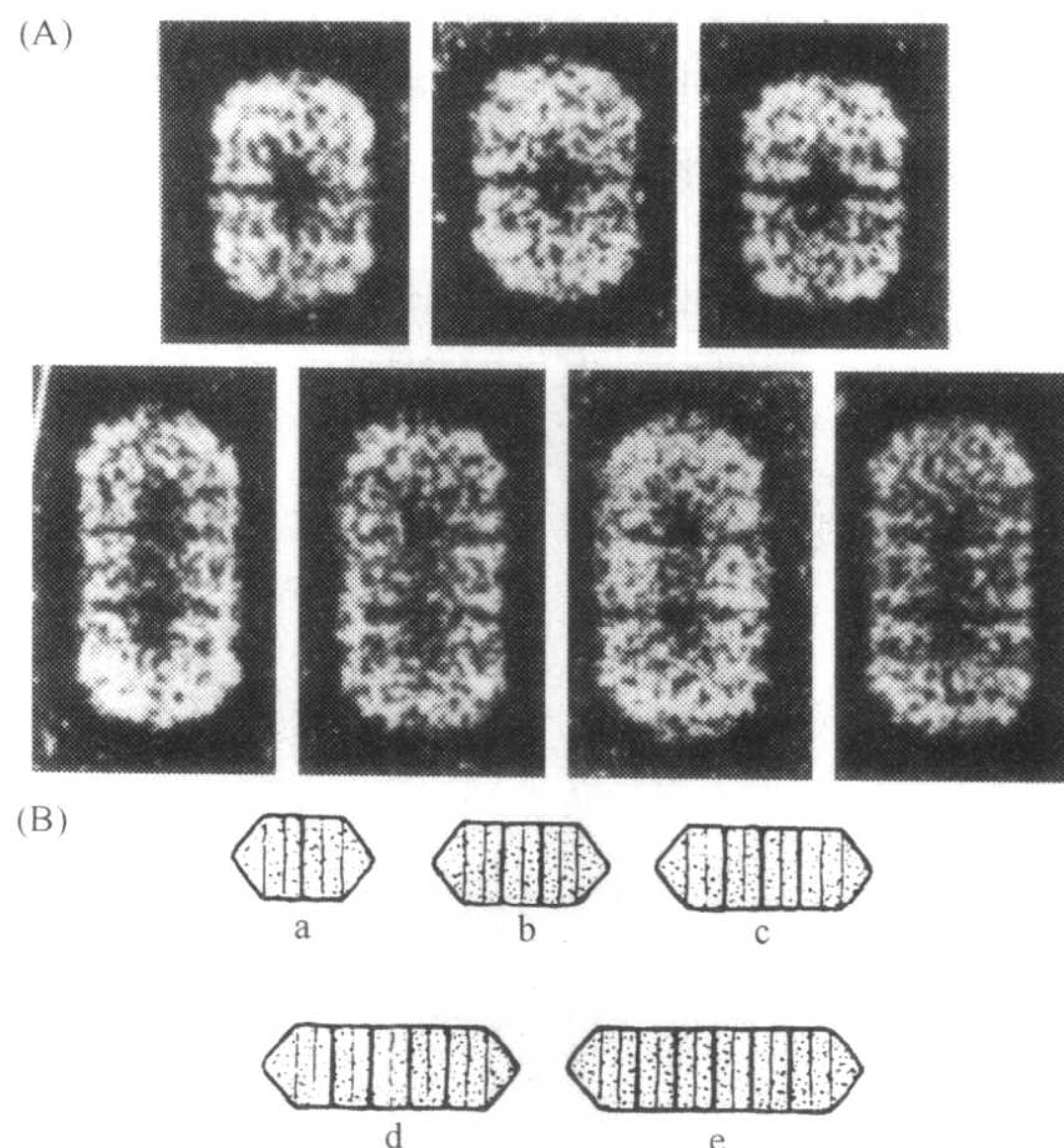


图 5.26　欧尔密甜瓜花叶病毒的结构。(A) 负染粒子的"均衡的"图像。每个图像是由相等的 10 个原始粒子图像叠加合成的。上排具有双层盘，下排具有 3 层盘。(B) 示意图显示在不同长度粒子上双盘(double disk) 的可能排列方式，d 型粒子尚未观察到。承蒙 R. G. Milne 提供照片，谨致谢意。

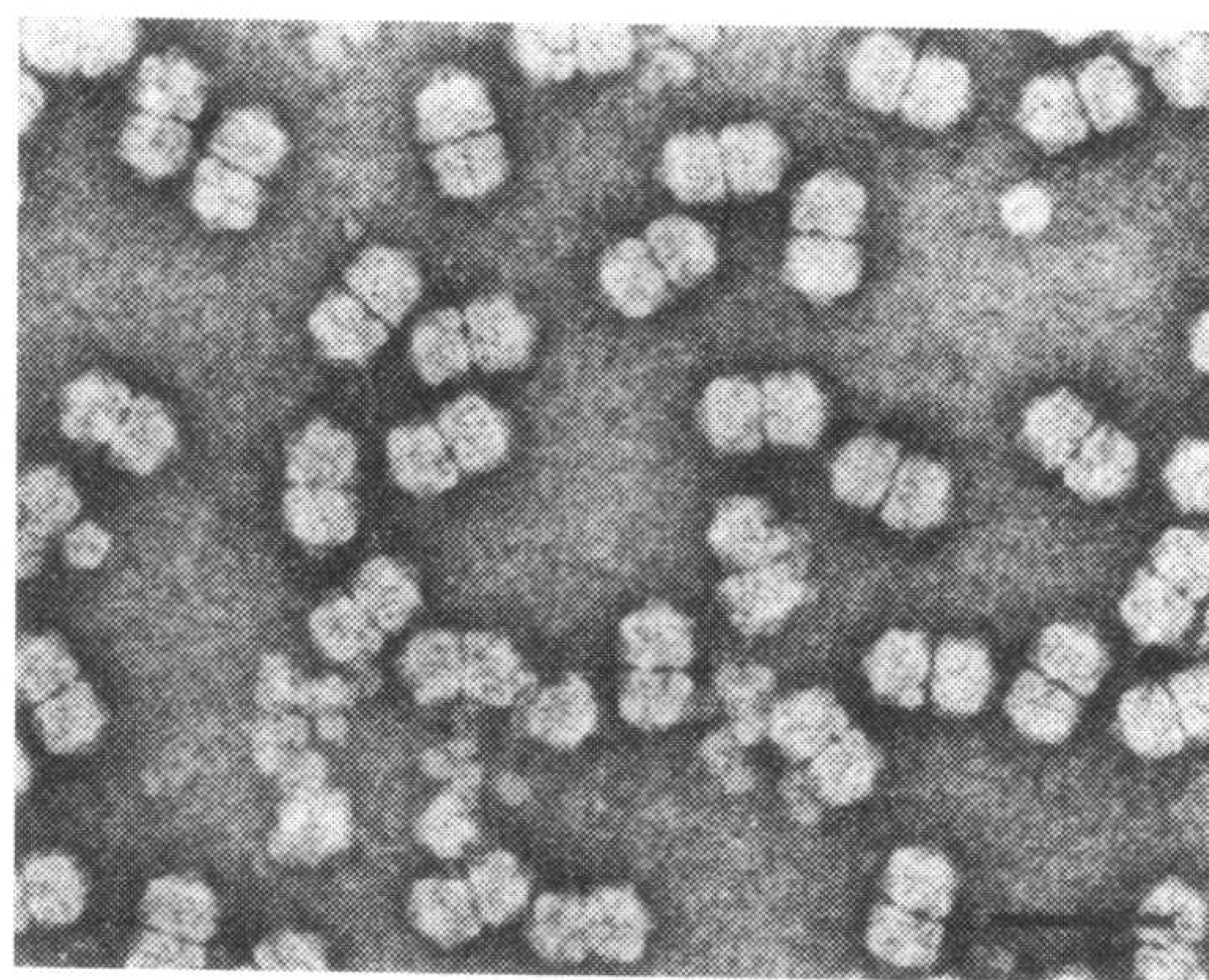


图 5.27　用 2%的醋酸双氧铀水溶液负染的、从马唐中提纯出来的双生病毒。标尺 = 50 nm；经允许，引自 Dollet 等 (1986)。

$T=1$ 的二十面体组成。这两个二十面体在都缺少一个形态亚基的位点彼此相连，得到由 22 个形态亚基组成的粒子。对病毒 DNA 和蛋白亚基大小的研究支持了这种结构。研究表明每个双生粒子外壳都由 110 个 28 kDa 的多肽排列成 22 个形态亚基构成，还包含一个相对分子质量为 7.1×10^5 (大约 2.1 kb) 的单链 DNA 分子。

利用 STNV 外壳蛋白作为模板模体进行原子坐标模拟，已推导出玉米线条病毒(MSV) 外壳蛋白的结构 (Zhang *et al.*, 2001) (图 5.28)。人们用冷冻电子显微术和三维图像重建方法确定了 MSV 粒子的微细结构 (Zhang *et al.*, 2001) (图 5.28)，并证

实了 Francki 等提出的模型（1980b）。

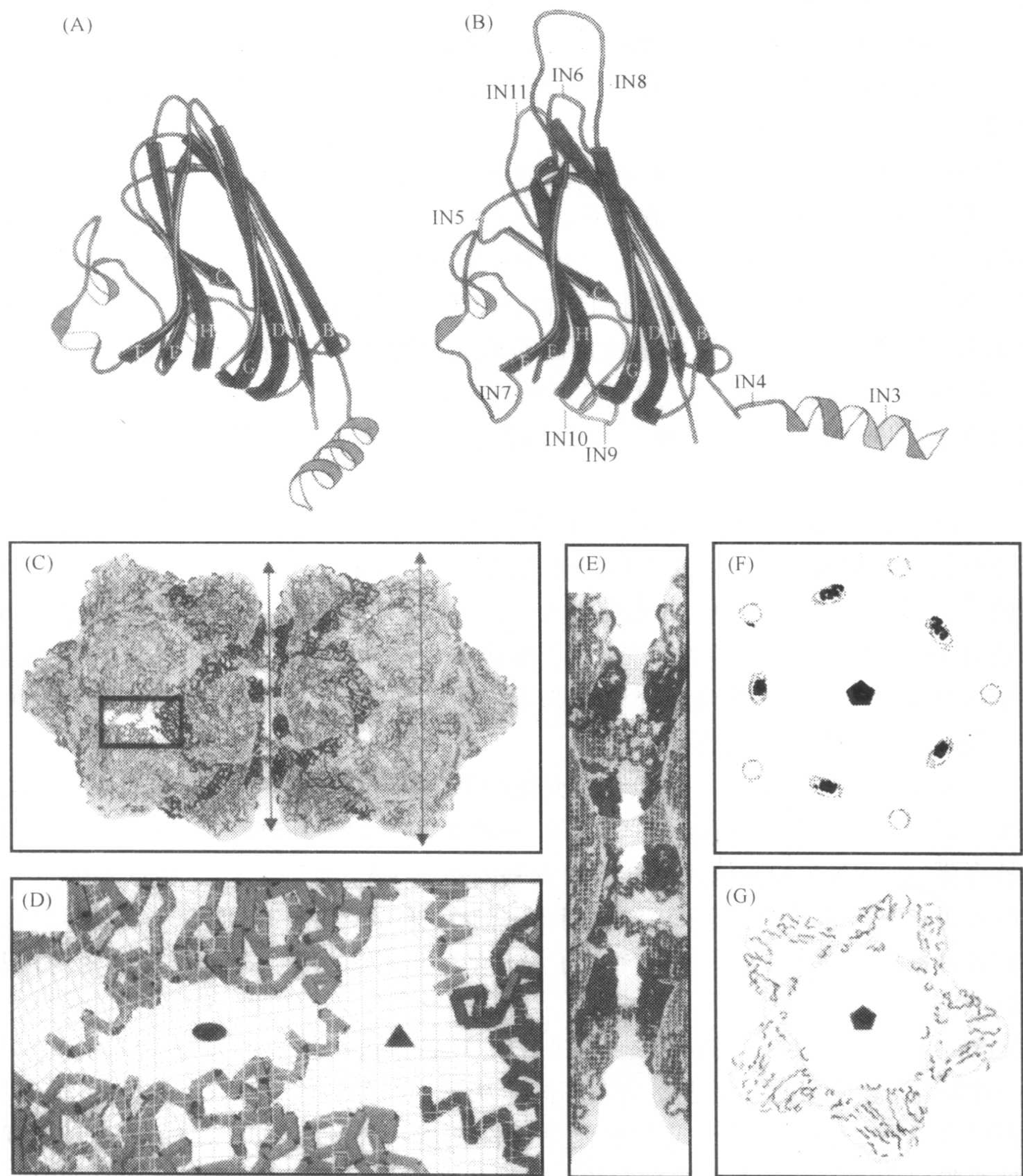


图 5.28（见彩色图版 5.2）MSV-N 外壳蛋白和完整衣壳的模型。（A）STNV 外壳蛋白多肽的带状图，（B）MSV-N 外壳蛋白多肽链的带状图。在这些图内，β 桶模体是蓝色，依据约定标出 β 折叠链。（C）MSV-N 的 110 个拷贝装配的拟原子模型，显示为 Ca 的示踪（黄色），两个上部的壳粒、10 个近五聚体的壳粒（peripentonal capsomere）和 10 近赤道的壳粒（equitorial capsomere）分别显示为绿色、红色和蓝色。长方框指示位置的放大图显示在图（D）和图（E），双箭头的横截面视图显示在（F）和（G）。（D）二十面体的二重和三重轴的近视图，以及（E）近赤道的壳粒互作。MSV-N 粒子的横截面（F）通过近赤道区域和（G）粒子的近五聚体的壳粒。二十面体的二重、三重轴和五重轴分别以黑色椭圆形、三角形和五聚体形表示。经允许，引自 Zhang 等（2001）。

4. *T* = 3 的粒子

a. 芜菁黄花叶病毒属（*Tymovirus*）

芜菁黄花叶病毒属病毒粒体直径约 30 nm，由一种大小约为 20 kDa 的亚基组成。

i. 粒子的类别

提纯的芜菁黄花叶病毒（TYMV）可以在氯化铯密度梯度中分成多个组分。存在下述三种类型的粒子：

(1) 空的蛋白外壳粒子。从感病叶子中分离到的 TYMV 提取物有 1/5～1/3 的粒子为空壳（顶部或 T 组分）。不含有 RNA 但外壳蛋白与有侵染性粒子的外壳蛋白有相同的结构（B_1组分）。

完整粒子通过冻溶（freeze-thaw）或碱处理可以转变成空粒子。当 TYMV 的 B_1组分在 pH 11.6 的 1 mol/L KCl 条件下，粒子在 30 s 之内从 14.6 nm 膨胀到 15.2 nm（Keeling *et al.*，1979）。3～10 min 之内 RNA 以部分降解的状态从粒子中释放出来。另外，在 1～3 min 之内一定量的蛋白质也会从每个病毒粒体上以粒子亚基的五聚体或六聚体的形式丢失，但不会以少量核蛋白的形式丢失（Keeling and Matthews，1982）。当 pH 降回到 7.0 时，膨胀空壳的直径可恢复到正常大小。只含有部分基因组 RNA 的核蛋白在 pH 11.6 的相同的条件下不会膨胀，RNA 也不会丢失，尽管会在粒子内部降解。

(2) 有侵染性的病毒核蛋白（B 或底部的组分及源于它们的粒子）。有侵染性的病毒部分在氯化铯梯度中分成均具有侵染性的两层（B_{1a}和 B_{1b}）（Matthews，1974）。现已经明确 B_1 中 1/3 为 B_{1c}，比 B_{1b}的密度更大。B_{1b}和 B_{1c}都含有外壳蛋白的 mRNA 拷贝和一个基因组 RNA 分子。在高浓度的 CsCl 溶液中，特别在 pH>6.5 的情况下，B_1组分可转变为更高密度的 B_2 系列，分别称为 B_{2a}、B_{2b} 和 B_{2c}。通过在 CsCl 溶液内加 0.1 mol/L $MgCl_2$可以防止 B_2的形成。

(3) 含有亚基因组 RNA、在氯化铯介质中密度介于 T 和 B 组分之间的核蛋白粒子。Mellema 等（1979）和 Keeling 等（1979）分离出 8 个次要组分系列。从这些粒子中分离到外壳蛋白 mRNA 和其他大小分散的亚基因组 RNA。但是，这 8 种亚基因组 RNA 所在的核蛋白种类还没有完全确定。如果外壳蛋白的 mRNA 和其他 8 个亚基因组 RNA 包装在各种不同的组合中，并且每个粒子含有多个拷贝，将会出现非常多的密度相差很小的粒子。

Mellema 等（1979）与 Keeling 等（1979）明确了这些次要的无侵染活性核蛋白组分的一些特性。它们 RNA 的含量分布不同，从第 1 部分的 5%到第 8 部分的 28%。相对于有侵染活性的核蛋白，次要的无侵染活性核蛋白大约占粒子总数的 5%。研究发现，外壳蛋白的顺反子在大多数次要的无侵染活性核蛋白中同其他亚基因组 RNA 一起存在（Pleij *et al.*，1977；Higgins *et al.*，1978）。

ii. 蛋白衣壳

Huxley 等（1960）以及 Nixon 等（1960）用负染的方法发现 TYMV 的外壳由 32 个突起物（形态亚基）组成，占据了外壳上两个不同的位点。Klug 及其同事充分地使用 TYMV 以建立分析小二十面体病毒的 X 光衍射和电子显微镜技术。Klug 等（1966）和 Finch 等（1966）得出蛋白衣壳在约 14.5 nm 的半径上具有 180 个分散的中心这一结论。这些点被鉴定为是分布在粒子表面的蛋白质结构亚基的突起。Canady 等（1995，1996）完成了分辨率高达 3.2 Å 的 X 射线分析图。

每个单独的蛋白亚基有点类似香蕉状。在完整的病毒内，每个蛋白亚基由约 9%的 α 螺旋和 43%的 β 折叠构成。大约有 48%的多肽没有规则的构象（Hartman *et al.*，

1978)。Tamburro 等（1978）完全证实了这一结论。多肽链形成了八股反平行的β折叠层结构（β桶）（图 5.29）（Canady *et al*.，1996）。

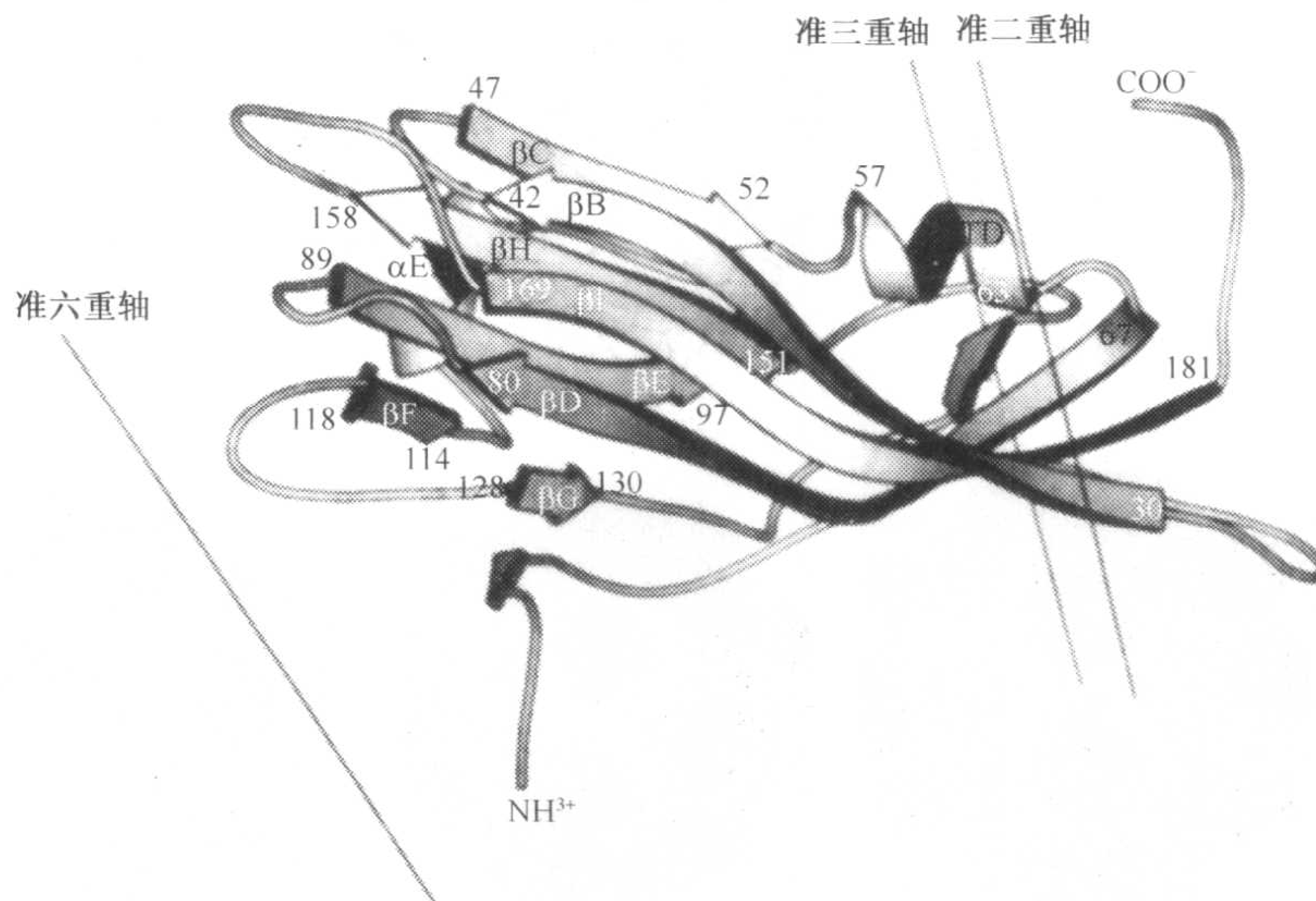


图 5.29 TYMV 外壳蛋白的带状示意图。图中标出了准六重、准三重和准二重轴的方向。显示了 B 亚基的结构。A 和 C 亚基除了在 A 亚基内 N 端 26 残基是无序的此外，实际上与 B 亚基是相同的。图中还标出了β桶的 8 条链，连同 N 端和 C 端。一个规则的α螺旋 CD 也被标出。出现在背面的 EF 螺旋不规则，具有 3_{10} 螺旋的一些性质。残基 6～8 和 140～142 也分别形成两个小的β折叠片段。经允许，引自 Canady 等（1996）。

该病毒的 X 射线数据与具有 32 个中心分散处于大约 121 Å 半径，并且伸展至 159 Å 半径处的蛋白衣壳模型非常一致。图 5.30（A）是对有关蛋白亚基的外部排列的已有知识的归纳。图 5.31 则表示这些粒子用三维图像重建技术得到的三维图像。因此，粒子表面的亚基按 $T=3$ 排列，五聚体和六聚体蛋白从粒子表面突出，并在准三重轴处形成深的沟。

在 A 亚基中 N 端的 26 个氨基酸残基是不规则排列的，但在 B 和 C 亚基中这些残基在准六重轴聚集的内部相互作用形成一个环面（annulus）（图 5.31）。

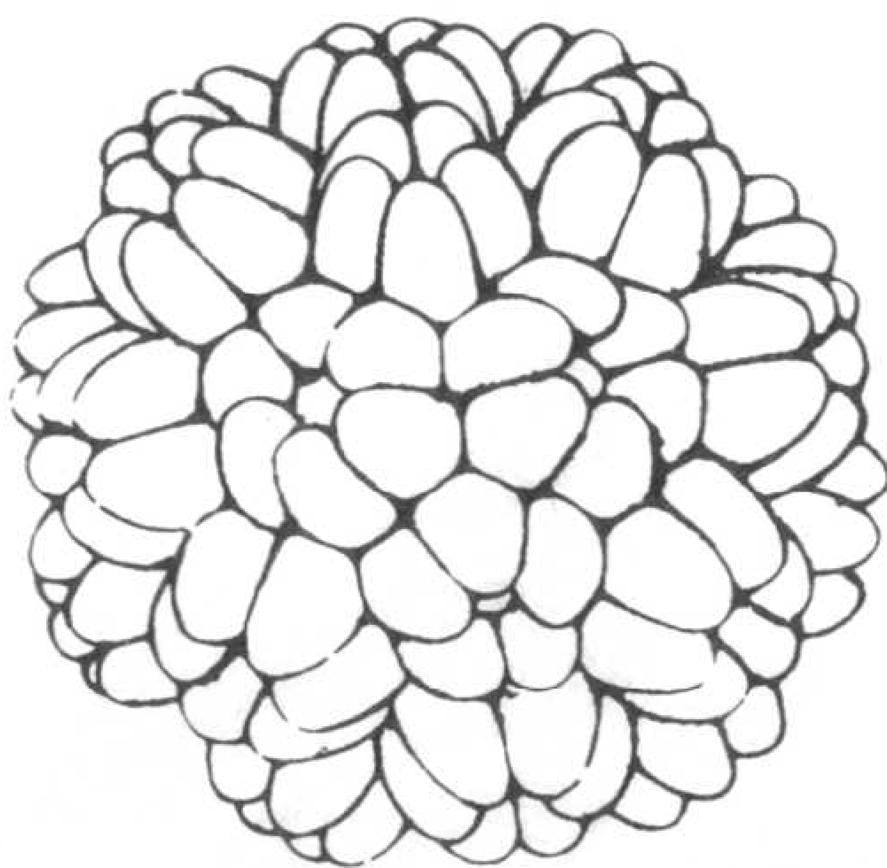
在 A、B 和 C 亚基之间存在着广泛的内在联系（图 5.32）。每个亚基的内部都有 3 个组氨酸并且易与基因组 RNA 相互作用。从病毒衣壳内表面来看当病毒解体时有一个五聚体亚基丢失。

Krishna 等（1999）已在 3.0 Å 水平上解析了芜菁花叶病毒属的酸浆花叶病毒（PhyMV）的结构。其基本结构与 TYMV 相似，但也存在一些差异。在组成 12 个五聚体的 A 亚基 N 端 17 个氨基酸残基的排列顺序与 TYMV 中的不同，组成六聚体壳粒的 B 和 C 亚基的构造则与已观察到的 TYMV 的完全不同。界面间的接点分析发现，六聚体的结合比五聚体紧密，六聚体与六聚体的结合比五聚体与六聚体的结合更紧密。这可用于解释空外壳的形成可能会随 A 亚基的 N 端臂构象的改变而起始。

iii. RNA 的位置

Finch 和 Klug（1966）认为 TYMV RNA 的折叠与 32 个形态蛋白亚基都有密切的

(A)



(B)

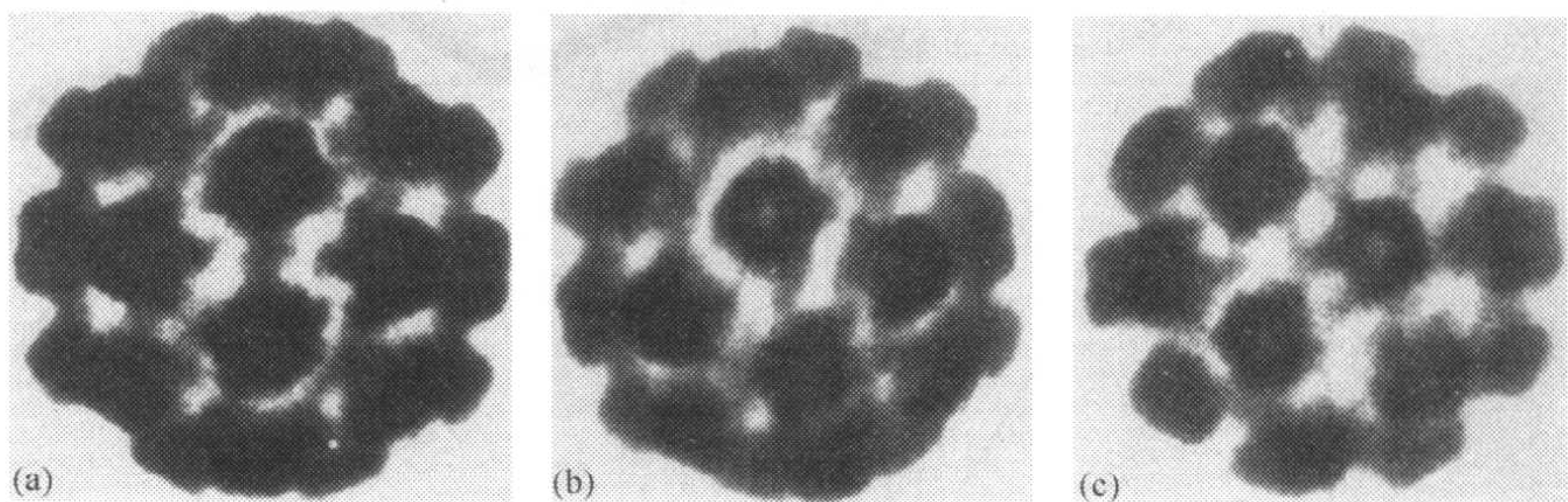


图 5.30 TYMV 的结构。（A）粒子外部图显示蛋白亚基聚集成五聚体和六聚体（引自 Finch and Klug，1966）。（B）通过标绘出各截面图并已经堆叠成一透明贴图的摄影板上所重建的密度分布视图。只有模型顶部的 3/4 被显示以便顶部形态单位与模型底部其他结构不重叠。视图大致在二重轴上（a）、三重轴上（b）和五重轴上（c）。（b）和（c）中央的形态单位分别清楚地显示六聚体和五聚体。侧面观察形态单位可见到轻微的圆锥形，在它们的基部凸出而与相邻单位形成连接。经允许，引自 Mellema 和 Amos（1972）。

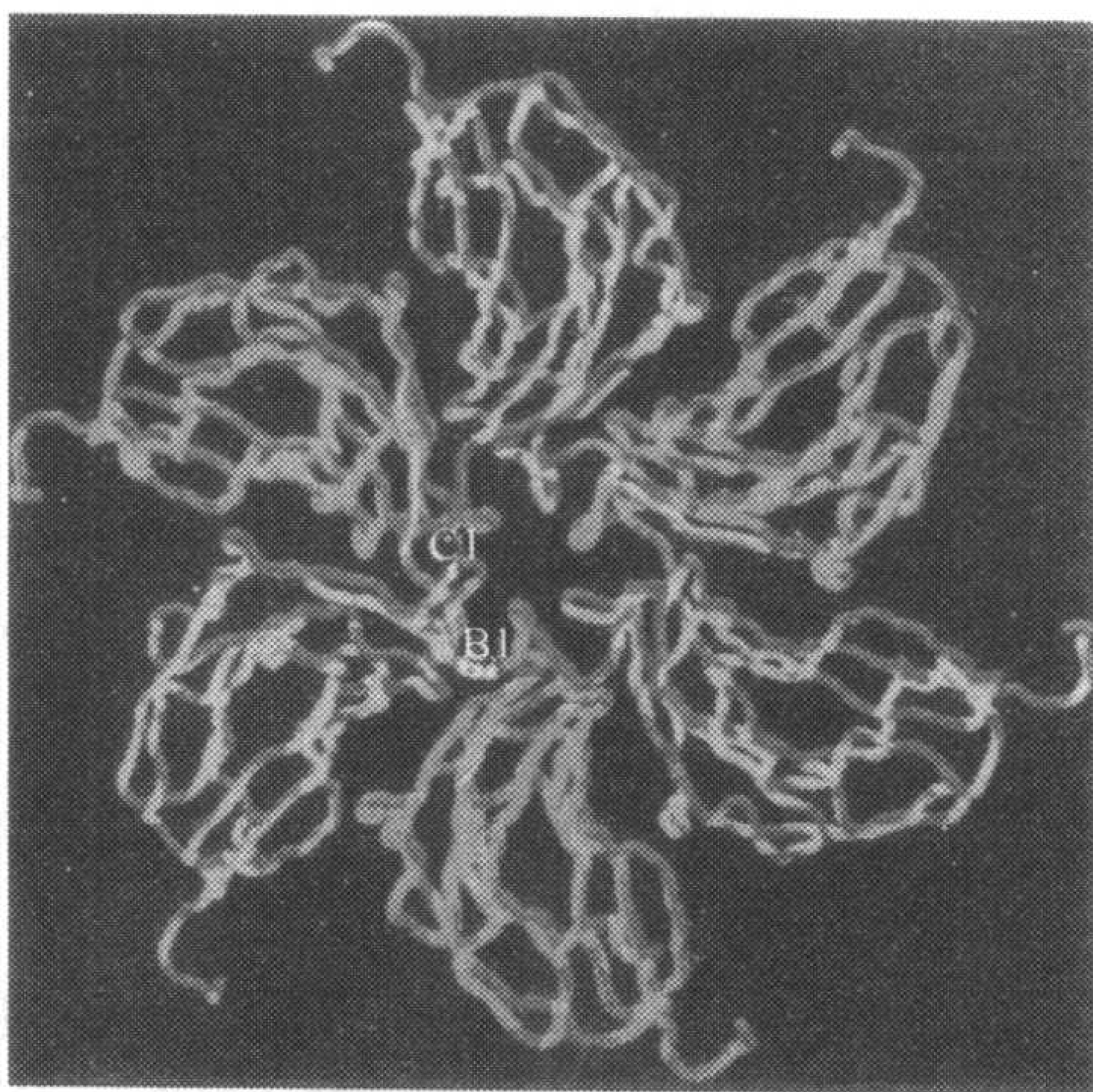


图 5.31 （见彩色图版 5.3）沿一准六重轴方向观察的图像。由 B（蓝色）亚基和 C（绿色）亚基的 N 端进入到 β 链 F 和 G 间环（FG 环）所形成环面的图像，每个亚基的前 1～10 残基涂成橘黄色（B）和红色（C）。在 A 亚基看不到的 N 端多肽交叠于每亚基下面，并且与残基 5 附近的相邻残基接触。承蒙版权所有者（© John Wiley and Sons Ltd.）的惠允，引自 Canady 等（1996）。

□ 准六重互作　　……… 主链间氢键

△ 准三重互作　　----- 盐桥

◇ 准二重互作

图 5.32 （见彩色图版 5.4）TYMV B-亚基的氢键、亚基间接触及易接近性的示意图。如果原子间的距离在范德华互作中为 4.11 Å，则氢键为 3.3 Å，盐桥为 3.8 Å；但如果残基间仅有小于 5 $Å^2$ 的可接近的表面区域，则将其视为难以接近的区域。承蒙版权所有者（© John Wiley and Sons Ltd.）的同意，引自 Canady 等（1996）。

联系。他们认为，与空的蛋白外壳作对比，正是由于在这些位点之内或周围存在 RNA 使得这 32 个形态蛋白亚基在电子显微镜下更容易观察到。但是利用中子小角度散射技术发现 RNA 几乎不会渗入蛋白外壳内，且蛋白亚基密集地聚在一起。比较冷冻电子显微镜下 TYMV 空外壳和完整粒子的蛋白外壳图像，可以确定在被充满的外壳内存在围绕三重轴的坚固内部结构，在空外壳中则不存在（Bottcher and Crowther，1996）。这提示着 RNA 的重要部分可能以二十面体结构排列。经 X 射线分析表明，基于 RNA 的密度可形成一个核心或一个带有半径约为 25 Å 空洞的、半径约为 40 Å 的中心，并且多个明显的突起沿着 5 重轴方向延伸至半径 75 Å 处。

b. 雀麦花叶病毒属（*Bromovirus*）

该属病毒的外壳蛋白直径为 25～28 nm，由 180 个分子质量为 19.4 kDa 的蛋白亚基组成。3 个基因组 RNA（RNA 1、RNA 2 和 RNA 3）分别包装；而编码 CP 的亚基因组 RNA 4 与 RNA 3 包装在一起。

i. 病毒的稳定性

虽然雀麦花叶病毒的 RNA 和蛋白外壳的结构排列与芜菁花叶病毒非常相似，但是它们非常不稳定。当 pH 升至 6.0～7.0，雀麦花叶病毒粒体的半径由 13.5 nm 膨胀到

15 nm 以上（Zulauf，1977）。这样的膨胀依赖于很多因素，特别是离子条件。病毒粒体在 pH 7.0 的 1 mol/L NaCl 中很容易解体。据 Bancroft 和 Horne（1977）报道，当膨胀的粒子解离后，在适当的条件下蛋白亚基可以重新装配形成一定结构的产物（参见第Ⅸ节 A）。特别有趣的是，在胰蛋白酶存在时 BMV 的蛋白衣壳在氨基端丢失 63 个氨基酸残基，并且能自装配成 $T=1$ 的空粒子壳（Cuillel *et al.*，1981）。BMV 在高压力下可以完全离解成亚基，形成 $T=1$ 的粒子结构是解离过程中的一个阶段（Silva and Weber，1988）。只有膨胀的粒子才能在高压条件下解离（Leimkühler *et al.*，2000）。

人们利用中子小角度散射的手段研究 BMV 结构的多态性（Jacrot *et al.*，1976；Chauvin *et al.*，1978）。在低 pH（5.0 左右）的离子条件下，病毒粒体处于致密状态；在接近 pH7.0 的中等离子强度下，病毒粒体膨胀，RNA 更深入蛋白亚基之间。而 Mg^{2+} 抑制这种作用。

滴定实验表明 BMV 的每个亚基都含有几个（可能是两个）阳离子结合位点。这两个位点的滴定值约在 pH 6.7。蛋白质的羧基和 RNA 的磷酸集团可能参与这种结合（Pfeiffer and Durham，1977）。当每个位点都与 H^+、Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 结合时，病毒粒体是紧密的。如果去除这些离子，病毒会膨胀。

外壳蛋白 N 端的 25 个氨基酸大多为碱性氨基酸，用结构预测方法人们指出这些序列可能以螺旋结构与 RNA 相互作用（Argos，1981），即形成一个 R 结构域。

ii. 粒子结构

Finch 等（1967b）发现 BBMV 的形态亚基从粒子主体至少突出 1.5 nm。负染色染料（negative stain）看来可进入到粒子中心，表明存在一个在 TYMV 中所没有的明显的中心孔洞。该孔洞的半径大约为 5.5 nm，利用 X 射线衍射和中子小角度散射的研究进一步证实了它的存在。Finch 和 Klug（1967）提出 TYMV 不存在中心孔洞可能是为了满足将更高比例的 RNA 包装到粒子中的需要。

人们利用 X 射线晶体学技术（分辨率 3.2 Å）和低温电子显微镜详细地研究了自然的和膨胀的豇豆斑驳花叶病毒（CCMV）的粒子结构（Spier *et al.*，1993；1995）。该外壳蛋白亚基的多肽链排列在 β 桶内，邻近亚基的 C 端交织在一起。通过金属离子（主要是 Ca^{2+}）调节的各亚基的羧基笼（carboxylate cage）间的相互联系以及蛋白质与特定 RNA 区域的相互作用进一步增加了粒子的稳定性。由于在羧基笼中静电排斥作用，粒子的膨胀导致了半径扩增至 29 Å。C 端交织结构的存在和蛋白质-RNA 间的相互作用阻止了粒子的完全解离。

iii. RNA 的定位

Fox 等（1998）利用冷冻电子显微镜研究 CCMV 得出结论，RNA 1、RNA 2 和 RNA 3+RNA 4 均以一种类似的方式在病毒衣壳的内表面包装。其病毒 RNA 在每个准三重轴上都出现有序的构造。

c. 黄瓜花叶病毒属（*Cucumovirus*）

提纯的黄瓜花叶病毒有 4 种 RNA 封装于 3 个直径为 30 nm 的粒子中，与雀麦花叶病毒的排列方式一样。黄瓜花叶病毒属病毒的一些分离物与一种小的卫星 RNA 有关（参见第 15 章第Ⅱ节 B.2）。

与研究蚕豆斑驳病毒（BBMV）一样采用电子显微镜的方法，Finch 等（1967a）

指出无论从表面结构还是粒子存在中心孔结构来看，CMV 都类似于雀麦花叶病毒属病毒。RNA 相当大地渗入到蛋白外壳中（Jacrot *et al.*，1977）。蛋白亚基的包装特点造成大约 15%（半径为 11.7 nm）的表面由孔洞组成，这使 RNA 暴露于钝化物质，这可能解释这种病毒对 RNA 酶很敏感的原因。

冷冻电子显微镜的观察并且以 23 Å 的分辨率的重建研究发现，CMV 结构与 CCMV相似（Wikoff *et al.*，1997）。利用 X 射线晶体学方法在分辨率为 8 Å 下证实了 CMV 的结构，其外壳蛋白亚基有 β 筒结构。因此，CMV 和 CCMV 粒子结构有以下几点相似之处：①粒子的形态；② β 折叠筒的大小和方向；③利于六聚体形成的稳定性互作；④亚基的一级序列。

但是，CMV 粒子与雀麦花叶病毒属病毒相比相对不稳定。当 pH 为 7.0 时 CMV 粒子不会和雀麦花叶病毒一样膨胀，或者在 pH 低于 7.0 时 CMV 也不会收缩。因此它们本质上以膨胀的粒子形式存在，主要靠蛋白质和 RNA 的相互作用使其稳定。

d. 番茄丛矮病毒科（*Tombusviridae*）

番茄丛矮病毒属的病毒粒体直径 30 nm，由分子质量为 38～43 kDa 的亚基组成，包装单一基因组 RNA。

利用晶体衍射已经在 2.9 Å 分辨率下确定了 TBSV 的结构（Harrison *et al.*，1978；Olson *et al.*，1983）。TCV 和 CarMV 的分辨率为 3.2 Å（Hogle *et al.*，1986；Morgunova *et al.*，1994）。每种病毒都包含有 180 个蛋白亚基，组成 $T=3$ 的二十面体的表面构造，粒子的外表面有明显的二聚体聚集，这些聚集物扩展到半径约为 17 nm。

TBSV、CarMV 和 TCV 均具有十分类似的结构。结构的主要特征参看图 5.33。蛋白亚基两个明显的球状结构域 P 和 S 由一个包含了 5 个氨基酸的易弯曲铰合部连接起来[图5.33(B)]。

TCV 的铰合部（hinge）上的突变不会影响病毒在植物体内的移动，但是会引起病毒导致一些症状的变化（Lin and Heaton，1999）。每个 P 结构域可以形成粒子表面上半个二聚体突出物，这些突出物占据了一个二十面体的三角形表面的大约 1/3。S 结构域组成二十面体壳的一部分，大约 3 nm 厚，其上有 90 个由一对 P 结构域组成的二聚体束突出。除了 P 和 S 结构域外，每个蛋白亚基还有一个易曲的、含有 102 个氨基酸残基的 N 端臂，其中包含 R 结构域和被称作“臂 a”的连接臂［图 5.33（B)］。

外壳蛋白在壳体上可能有两种差异较大的构象方式，P 和 S 两个结构域间的夹角大约相差 20°［图 5.33（D)］。构造方式是由亚基在 $T=3$ 的表面网格中是否为准二重对称还是真二重对称来确定。易弯曲的 N 端臂的存在状态也取决于对称结构的位置。

源于邻近的严格二分体（strict dyad）的 N 端臂在两个邻近 S 结构域的缝隙处顺序排列。这样的臂以逆时针方向（从粒子的表面看）缠绕在三重轴上。源于相邻的两个标准二聚体的另外两个 N 端臂将缠绕各自的三重轴。三条多肽链彼此重叠形成一个环绕三重轴的圆形结构，称为 β 环带，由每个臂各提供 19 个氨基酸（图 5.34）。只用 180 个 N 端臂中的 60 个形成互锁的网络结构，理论上，可形成一个开放的 $T=1$ 结构，而不需另外的 120 个亚单位。在准二聚体中 R 结构域和“a”连接臂则源于这 120 个亚单位，它们以不规则的方式深入粒子的内部，所以不能用 X 射线对其详细的位置进行分析。TBSV 的 RNA 被紧紧的包裹在粒子中，而这些 N 端多肽臂很可能与 RNA 相互作用。

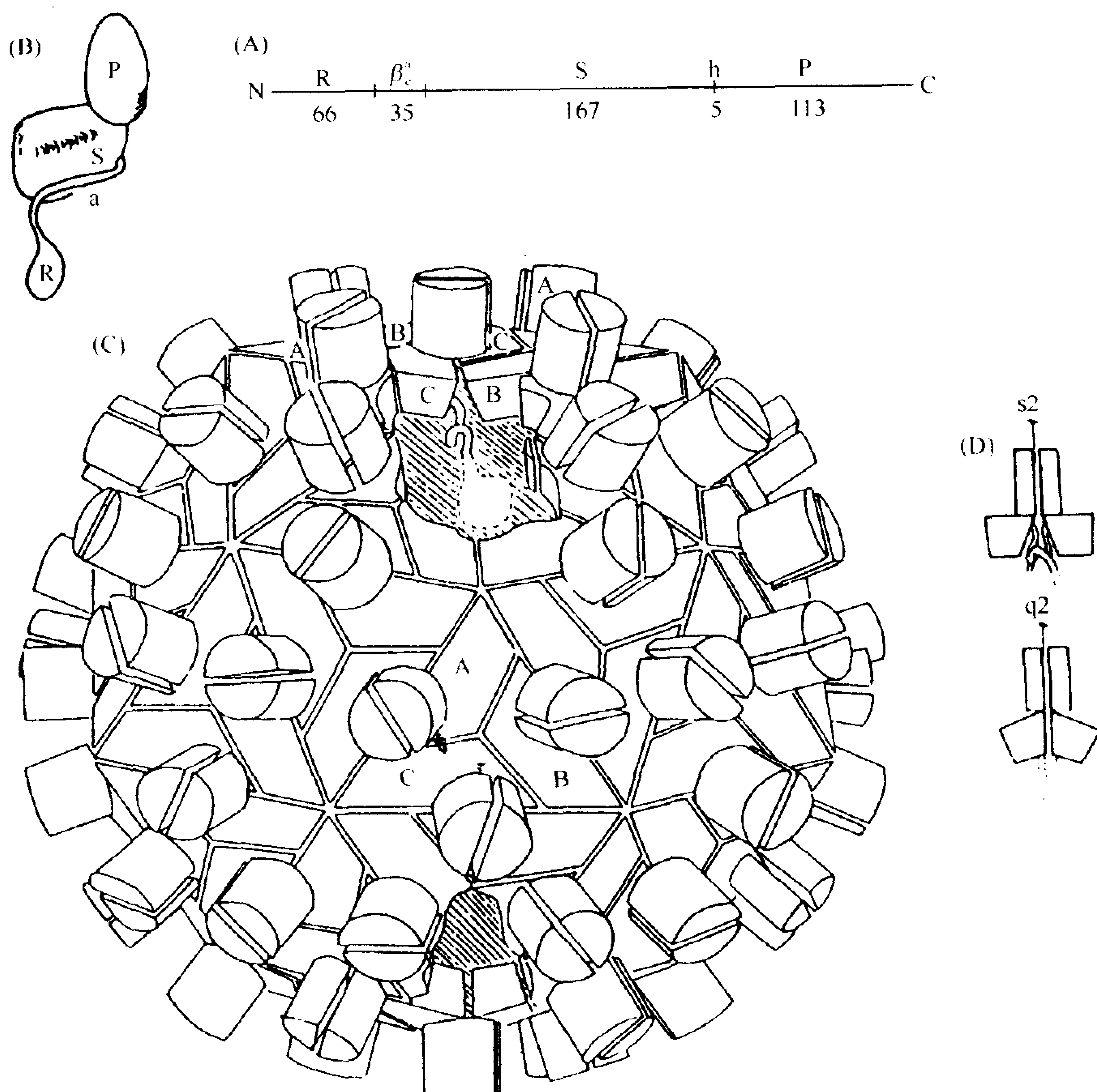


图 5.33 TBSV 粒子的结构。(A) 多肽链结构域从 N 端到 C 端的顺序。每一段上残基的数在线下已标出。字母标出 R 结构域（可能为 RNA 结合区）、臂 a（形成 β 环带的接头、在 C 亚基伸出臂结构、而在 A 和 B 亚基保持无序）、S 结构域、铰合部 h 和 P 结构域。(B) 多肽链折叠示意图，显示 P、S 和 R 结构域。(C) 亚基在粒子内的排列。A、B 和 C 表示亚基的不同的包装环境。A 亚基的 S 结构域沿着五重轴包装；B 和 C 亚基的 S 结构域沿三重轴包装。在衣壳被切下露出 S 结构域的两处可以看见局部曲率的差异，即接近严格二分体（上部）和准二分体（dyad）（下部）。(D) 该结构中的 TBSV 亚基的两种状态，即以严谨二重轴（s2）和局部（q2）二重轴对称的二聚体。在 C 位置的亚基具有结构域间的“上”铰合部和二重轴相关 S 结构域间的裂缝，N 端臂的部分折叠进入该裂缝。在准二重轴相关的 A 和 B 位置的亚基具有与 S 结构域靠近的“下”铰合部，和一个无序的臂。经允许，(A)、(B) 和 (C) 引自 Olson 等（1983）；(D) 引自 Harrison 等（1978）。

S 结构域间形成的每一个三聚体接触处的特征是具有两个二价阳离子的结合位点（图 5.34）。当 pH 高于 7.0 时，如果二价阳离子被除掉，粒子会膨胀。当 TCV 的钙离子结合位点发生突变会影响病毒细胞间运动或长距离运输，或者会引起延缓的轻微系统症状（Laasko and Heaton，1993；Lin and Heaton，1999）。

TNV 的晶体结构已经达到 2.25 Å 的分辨率（Oda *et al.*，2000）。它的基本结构类似于其他 $T=3$ 的二十面体病毒，但是细节上看该病毒的三级和四级结构与南方菜豆花叶病毒属病毒相比，与番茄丛矮病毒科更相似。

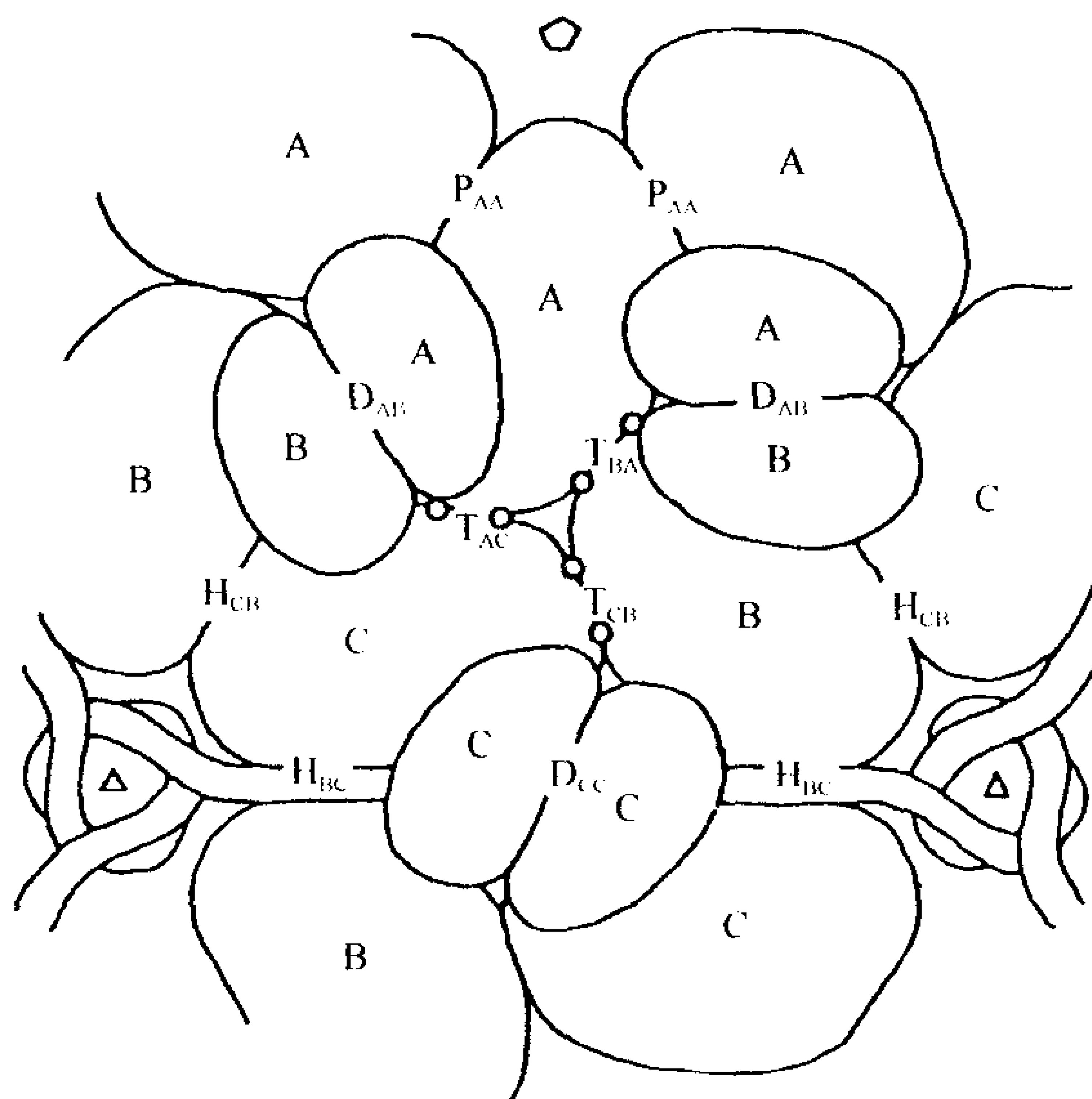


图 5.34 TBSV 在二十面非对称单位上亚基的包装和接触面的标记。亚基接触的不同种类分别标为 D（二聚体）、T（三聚体）、P（五聚体）、H（六聚体），用下标表示亚基互作接触的类型。Ca^{2+} 的位置在 T 接触面用小圆圈表示。在示意图的上部有一五重轴被标出。具有三重对称的 2 个 β 环带在示意图的下部标出。经允许，引自 Olson 等（1983）。

e. 南方菜豆花叶病毒属（*Sobemovirus*）

南方菜豆花叶病毒属病毒粒体直径为 30 nm，由分子质量约为 30 kDa 的蛋白亚基中间包裹着一种 RNA 构成。用负染几乎不能观察清楚这种病毒表面的细微结构。

南方菜豆花叶病毒（SBMV）的结构已经精确到分辨率为 2.8 Å（Abad-Zapatero *et al.*，1980；Silva and Rossmann，1987）。蛋白亚基 S 结构域的折叠与番茄丛矮病毒（TBSV）非常相似（图 5.20B）。SBMV 与番茄丛矮属病毒相似之处是都有一个氨基末端的 R 结构域，但不同的是 SBMV 没有 P 结构域。P 结构域的缺失使蛋白亚基更小（260 个氨基酸比 380 个），外部半径减小，并且在电子显微镜下观察到病毒粒体的外观更光滑。

三个近等蛋白亚基（A、B 和 C）的排列与 TBSV 非常相似。与 TBSV 一样，C 亚基 R 结构域的一部分有序地围绕着每个二十面体三重旋转轴形成 β 环带。但是 R 结构域比 TBSV 的更短。A 亚基和 B 亚基的前 64 个残基（R 结构域）以及 C 亚基的前 38 个残基的排列不规则，且与 RNA 相关联。阳离子（Ca^{2+}）位点接近于壳体的外表面，病毒结构的完整性非常依赖 Mg^{2+} 和 Ca^{2+}。每个蛋白外壳很牢固地结合了大约 200 个离子，用 EDTA 去除这些离子使结构发生可逆的不稳定性。胰蛋白酶处理可除去分离的蛋白亚基 N 端的 61 个氨基酸。得到的 22 kDa 片段可以装配成直径为 17.5 nm 的 $T=1$粒子（Erickson and Rossmann，1982）。Rossmann（1985）得到了 SBMV 的更精确的结构。

用冷冻电子显微镜和图像重建方法，Opalka 等（2000）发现了 SCPMV 具有沿着双重轴的深谷外表面和在准三重旋转轴上的突出物，然而 RYMV 的表面相对光滑。两

种病毒的粒子在其外壳以下还有两个密度同心层，它们被解释为由基因组 RNA 有序排列而成的。

在 3.0 Å 的分辨率下研究田菁花叶病毒（Sesbania mosaic virus）的结构表明，与 SBMV 相比虽然基本结构相似，但有些不同（Bhuvaneshwari *et al.*，1995）。田菁花叶病毒在准三重轴上两极间的相互作用比较弱。亚基面对 RNA 一面的带正电荷残基和 N 端臂（R 结构域）保守性不好，这表明两病毒在蛋白质和 RNA 的相互作用存在差异。

f. 豌豆耳突花叶病毒

豌豆耳突花叶病是由 PEMV-1 和 PEMV-2 两种病毒复合侵染造成的（参见第 2 章 第Ⅲ节 P.3）。这两病毒等长的基因组包裹于由 PEMV-1 编码的相同的外壳蛋白内。混合物中有两种大小的粒子，包裹 RNA1 的粒子直径约 28 nm，包裹 RNA2 的粒子直径约 25 nm。PEMV-1 在氯化铯中稳定，但 PEMV-2 不稳定。在 Cs_2SO_4 和用 D_2O 配制的蔗糖梯度中两病毒条带处于同一密度（Hull and Lane，1973；Hull，1976b），这表明它们含有非常相似的核酸含量。根据估计的病毒粒体和外壳蛋白的分子质量大小，Hull 和 Lane（1973）认为 PEMV-1 粒子是由 180 亚基组成，这与 $T=3$ 的二十面体结构一致，但 PEMV-2 粒子只有 150 个亚基。推测 PEMV-2 具有准二十面体模型（Hull，1977b）。

用聚丙烯酰胺凝胶电泳可将 PEMV-1 和 PEMV-2 的两种粒子分开（Hull and Lane，1973）。有些株系不能蚜传，在胶上形成两个均匀的条带，但是其他可蚜传的株系中 PEMV-1 的条带很不均一（Hull，1977c）。造成这种不均一性的原因还不清楚。

5. $T=3$ 对称的杆菌状粒子

第Ⅴ节 F 已经提到，人们早已提出杆菌状粒子的结构是以二十面体对称结构为基础的。RTBV 是 130 nm×30 nm 的杆菌状粒子。从外壳蛋白的大小和粒子的直径来看，这些粒子被认为是以 $T=3$ 的二十面体对称结构为基础的（Hull，1996）。RTBV 粒子的电子显微照片的光学衍射表明，其形态亚基大小为 100 Å，为基于三重旋转轴的 $T=3$的二十面体结构。

6. 假 $T=3$ 的对称

豇豆花叶病毒属、绝大多数线虫传多面体病毒属、蚕豆病毒属和伴生病毒属病毒都是由一种、两种或三种外壳蛋白组成的二十面体粒子。这种结构类似于小核糖核酸病毒的结构，如果所有的外壳蛋白种类一致，将出现 $T=1$ 结构。然而具有一种或两种外壳蛋白种类的病毒中较大的多肽可组成“假分子”（pseudomolecule），因为每个病毒的结构可以认为是由三“种”蛋白质有效组成的。因此，会产生一个假 $T=3$ 的对称。

a. 豇豆花叶病毒属（*Comovirus*）

豇豆花叶病毒（CPMV）的直径约为 28 nm，其二十面体结构亚基的排列特殊。病毒的外壳含有两种氨基酸组成不同的蛋白质，一大一小（42 kDa 和 22 kDa）（Wu and Bruening，1971）。CPMV 的提纯物有三类粒子（B 组分含有大 RNA，M 组分含小 RNA，T 组分中为空粒子），各种粒子具有同样的蛋白外壳。它们可以通过离心区分开。早期对这种病毒的研究主要的问题在于小蛋白质在体外很容易被寄主植物和提纯后的病毒里含有的蛋白水解酶降解。CPMV 的每个粒子中含有大约 200 个亚精胺分子和

极少量的精胺。

根据蛋白质和病毒壳粒的大小，Geelen 等（1972）计算出每个壳粒含有两种结构蛋白各 60 个。利用这些信息和数据他们得到了三维重建结构图。Crowther 等（1974）提出一个模型，认为 60 个大蛋白质在 12 个五重轴对称位置聚集，60 个小蛋白质形成 20 个三聚体（图 5.35）。

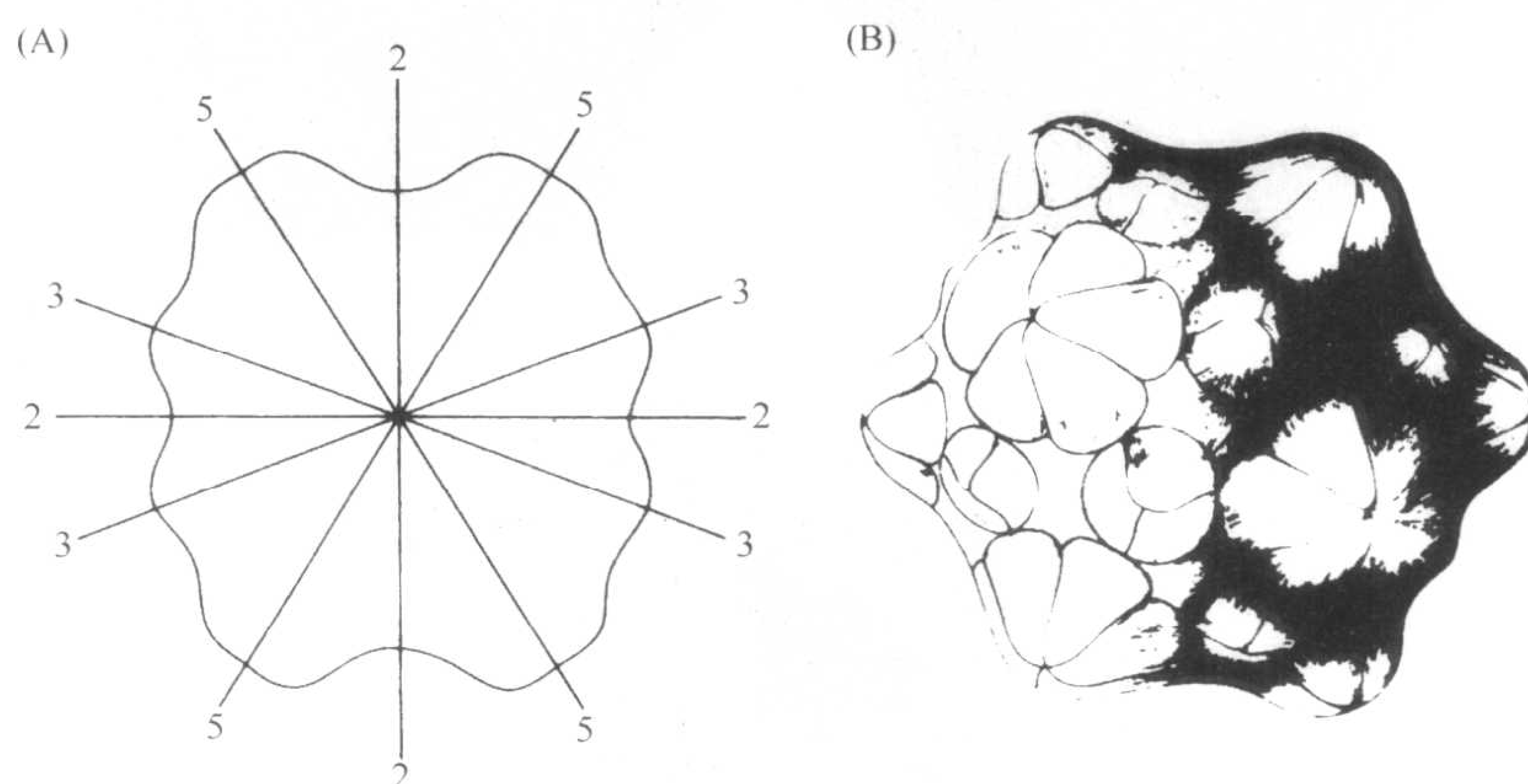


图 5.35　基于图像重建和已知化学组成推测的 CPMV 结构。(A) 病毒表面轮廓与对称轴的关系。标出了位于平面的二重轴、三重轴和五重轴的位置。五重轴、三重轴和二重轴位置处病毒轮廓的半径大约为 12.0 nm、10.6 nm 和 9.3 nm。二重轴位置处的凹口的宽度（位于两个五重轴之间）是位于两个三重轴之间宽度的 2 倍。(B) 模型示意图。大蛋白亚基在五重轴位置聚集，而小蛋白亚基在三重轴位置聚集。经允许，引自 Crowther 等（1974）。

虽然 CPMV 粒子很清楚是 $T=1$ 的二十面体结构，但实际上在不同的对称环境下有两种蛋白质，这在整体上与 $T=3$ 结构有些相似之处（Schmidt and Johnson，1983）。利用 X 射线晶体学的方法人们得到了分辨率为 3.5 Å 的 CPMV 粒子结构，Lin 等（1999）将其精确到 2.8 Å，并指出在二十面体不对称基团中由两种外壳蛋白形成三种明显的 β 折叠结构域（图 5.36）。虽然这些 β 折叠以共价连接，它们之间的关系本质上类似于小核糖核酸病毒（picornaviruses）中三种主要分离的外壳蛋白间的 β 折叠层。

已经推断出 BPMV（Chen *et al.*，1989）和 RCMV（Lin *et al.*，2000）的类似结构，RCMV 的结构精确到 2.4 Å。比较 CPMV、BPMV 和 RCMV 的结构，Lin 等（2000）得到了小亚基 N 端的结构指纹，可用于豇豆花叶病毒属病毒的亚组归类。

BPMV 粒子中近 20% 的 RNA 以类似于在二十面体对称结构中的方式结合在蛋白衣壳的内部。结合的 RNA 是单链的，与蛋白质的相互作用受到非键合力的控制，它们之间存在着很少特异性的接触（Chen *et al.*，1989）。通过在 3.0 Å 水平上分析 BPMV 的蛋白质与核酸间相互作用，Chen 等（1989）认为结构规则的 7 个核糖核酸排列在由大外壳蛋白共价连接的结构域组成的蛋白外壳内表面上的浅凹穴内。

b. 矮化病毒属（*Waikavirus*）

水稻东格鲁球状病毒（RTSV）是直径 30 nm 的二十面体，在电子显微镜下观察不到明显的结构特征。衣壳中分子数量相同的三种外壳蛋白均由一个多聚蛋白加工而成

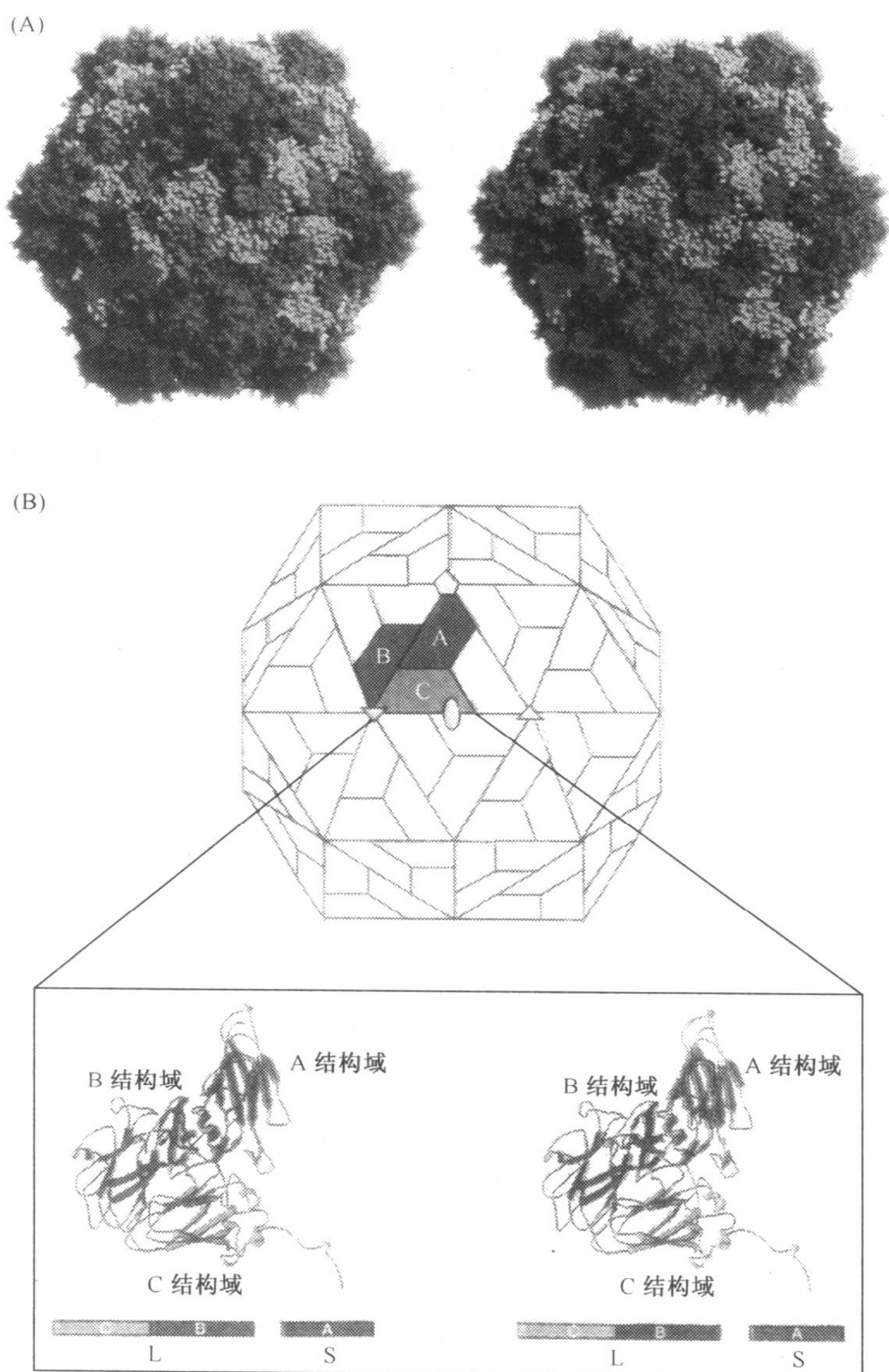


图 5.36（见彩色图版 5.5）RCMV 病毒衣壳和二十面体非对称单位的结构。RCMV 存在两种蛋白质（S 亚基和 L 亚基）。S 亚基形成 A 结构域（蓝色），L 亚基形成 B（红色）和 C（绿色）结构域。（A）RCMV 衣壳的空间填充立体图。所有原子以直径 1.8 Å 的小球表示。形成五聚体的 S 结构域形成突出物。（B）顶部，衣壳的二十面体非对称单位在 CPMV 衣壳示意图中以颜色编码。S 结构域占据 A 位置，沿五重轴形成 A 结构域；L 亚基的两个结构域占据 B 和 C 位置。位置 A、B 和 C 是相同基因产物在 $T=3$ 表面网格的准等价位置。底部，显示为二十面体非对称单位的条带示意立体图。所有三个结构域是果冻卷 β 折叠结构的变异体。复合蛋白的示意图，L 和 S 结构域也显示。经允许，引自 Lin 等（2000）。

（Druka *et al.*，1996）。

7. $T=7$ 的粒子（花椰菜花叶病毒属病毒）

花椰菜花叶病毒（CaMV）是一种极为稳定的等轴粒子，直径约 50 nm，含有双链

DNA。环形双链 DNA 包裹在从 58 kDa 前体加工而成的蛋白亚单位中。58 kDa 的前体可加工成多个产物，主要为大约 37 kDa 和 42 kDa 产物。有证据表明，病毒外壳中含有少量 ORF III 的产物（参见第 11 章第Ⅲ部分 F）。电子显微镜下可以看到一个没有结构特征的相对较光滑的蛋白外壳。中子衍射研究发现，中心有一个直径约为 25 nm 的空洞（Chauvin *et al.*，1979；Kruse *et al.*，1987），并提出有 4 个同心圆衣壳结构。病毒粒体由外部的一层蛋白壳粒构成，其内是 DNA 和蛋白质同在的区域。该区域多数是 DNA 少数是蛋白质，在粒子的中心部只含有溶剂（占 1/8 体积）。人们没有发现 DNA 与任何明显数量的类组蛋白相结合（Al Ani *et al.*，1979b）。把病毒暴露在 pH11.25 体系中时，会导致 DNA 的末端释放，但病毒的蛋白外壳不会解体（Al Ani *et al.*，1979a）。

从病毒外壳蛋白的分子质量和蛋白质数量可以计算得出，该病毒具有 $T=7$ 的二十面体结构（Krüse *et al.*，1987）。用冷冻电子显微镜和图像重建的方法，已确定分辨率约为 3 nm 的 CaMV 结构（Cheng *et al.*，1992）。这些研究表明，CaMV 粒子由 3 个不含溶剂、致密的同心层组成，它们围绕在一个大的（直径为 27 nm）充满溶剂的腔周围（图 5.37）。

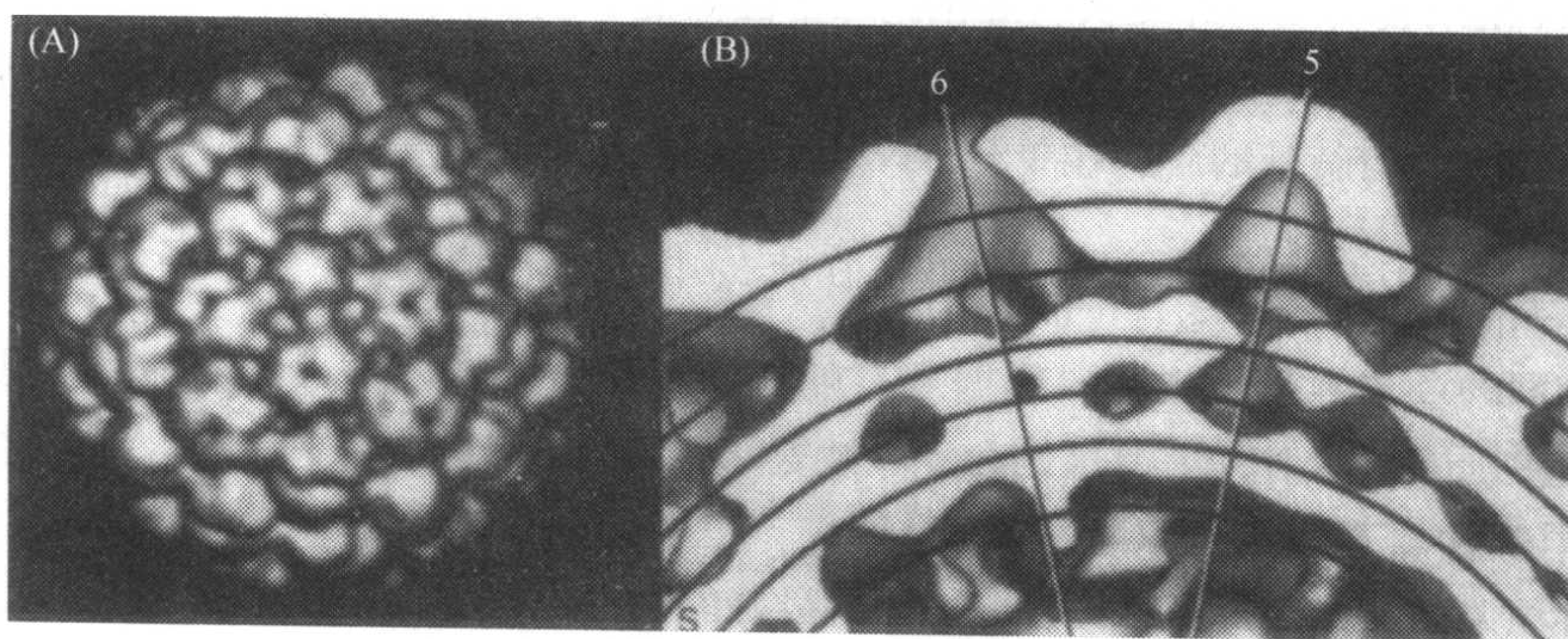


图 5.37 （A）CaMV 表面结构的重建，显示 $T=7$ 对称；（B）表面重建剖面图，显示多层结构。经允许，引自 Cheng 等（1992）。

外层（Ⅰ）由 12 个五聚体和 60 个六聚体按 $T=7$ 的二十面体对称结构组合而成，这是第一个 $T=7$、遵从二十面体结构规则的病毒例子。双链 DNA 基因组和一些衣壳蛋白共同分布在第二层和第三层。

C. 二十面体病毒内核酸的排列

对于大多数二十面体病毒，人们不可能得到粒子内部核酸的详细排列图，因为它们不能形成可用当前的技术识别的规则结构。在某些例子中，已注意到有些特定的病毒内存在规则的结构。尽管如此，仍可总结出一些粒子内部核酸排列的共同之处。

1. 双螺旋结构的比例

在许多小二十面体病毒中的 RNA 有可能存在双螺旋结构。例如，Haselkorn（1962）研究减色现象得出 TYMV 中至少 2/3 的碱基具有规则的结构。激光拉曼光谱学研究表明，大约 77%的 RNA 具有 α 螺旋结构（Hartman *et al.*，1978）。圆二色性研究证实了 RNA 含有相当数量的碱基配对和（或）碱基堆集，分离出的 RNA 的构型和

体内RNA的构造非常相似（Tamburro *et al.*，1978）。

Kaper等（1965）用减色实验分析完整的CMV和分离的RNA得出结论，在病毒内的RNA具有很高程度的二级结构，等同于70%的螺旋含量。

Denloye等（1978）用圆二色性研究TRoV，指出粒子内的RNA有相当程度的碱基配对。利用激光拉曼光谱学分析可以确定在CCMV中RNA有序的二级结构达到很的高程度（约95%）（Verduin *et al.*，1984）。

对几种二十面体的植物病毒在溶液中磁感应双折射研究结果表明至少有部分的RNA核心具有不同于蛋白外壳的对称结构（Torbet，1983）。^{31}P核磁共振研究显示在10℃时AMV粒子内的RNA缺少运动，但是在25℃时这些组分有些运动（Kan *et al.*，1987）。

2. 碱基序列的作用

对于在二十面体病毒中RNA序列在RNA折叠中是否起作用这一问题，Yamamoto和Yoshikura（1986）通过利用计算机系统计算RNA的二级结构已给出了解答。计算了20个病毒RNA结果表明，与螺旋状病毒相比二十面体病毒的基因组折叠的可能性更大。把病毒序列折叠的可能性与相同碱基随机排列的序列相比较，病毒的序列存在更多折叠。这些结果表明在病毒内碱基的序列在单链RNA基因组的折叠中起一定的作用。

3. 在小二十面体病毒中RNA和蛋白质的相互作用

在前面的章节中已经提到，依据现有的知识可以认为在小二十面体病毒中具有两种RNA和蛋白质的相互作用，其区别在于碱性氨基酸侧链或多胺能否中和RNA的磷酸盐。

a. 病毒中碱性氨基酸结合RNA中的磷酸

碱性氨基酸中和RNA的磷酸盐研究得最好的是TBSV（Olson *et al.*，1983）。总共21个赖氨酸和精氨酸就可有效地结合磷酸盐（11个在R结构域上，4个在臂上，还有6个在S结构域的内表面上）。因为与每个蛋白亚基对应的大约有26个RNA的核苷酸，大多数RNA的电荷可被这些氨基酸中和。R臂的柔韧性结合使RNA的包装无规律遵循。

SBMV也存在相似的情况（Silva and Rossmann，1987）。STNV中与RNA作用的氨基酸臂更短（Jones and Liljàs，1984）。蛋白外壳内表面和氨基酸臂所带的正电可以有效地中和70%的RNA磷酸盐。剩下的30%可能通过结合Mg^{2+}来中和（Liljàs *et al.*，1982）。

BMV外壳蛋白有一个碱性氨基酸末端区域，它可能以一个螺旋状结构与RNA相互作用（Argos，1981）。一个缺失了BMV外壳蛋白碱性臂N端的前25个氨基酸的外壳蛋白突变株不能直接包装RNA（Sacher and Ahlquist，1989）。缺少前7个氨基酸的突变株在体内可以包装病毒RNA。

Argos还预测，在AMV外壳蛋白的氨基末端存在类似的螺旋状结构。有10～15个氨基酸渗透到RNA中（Oostergetel *et al.*，1983）。RNA的磷酸盐中和这些螺旋中的正电荷，并使其稳定。这些N端臂的组分与组蛋白相似（Argos，1981）。这些病毒的结构中都不存在多胺。

b. TYMV

没有证据表明TYMV中蛋白质明显地渗入到RNA中，在蛋白质和RNA的接触面也

没有碱性氨基酸的聚集。Ehresmann 等（1980）用原位交联方法证明了外壳蛋白中有 3 个区域接近 RNA。胞嘧啶是在交联中相关最显著的碱基，但是在交联结合的肽链中碱性氨基酸并不丰富。TYMV 和同属另一个病毒 EGMV 的蛋白外壳序列分析，结果表明两个蛋白质都没有碱性残基的聚集，能与 RNA 形成很强的离子互作（Dupin *et al.*，1985）。

TYMV 内 RNA 的稳定可能通过两种相互作用实现：第一，谷氨酰和天冬氨酰侧链以氢键的方式与胞嘧啶的磷酸基结合（Kaper，1972）；第二，病毒中存在的精胺和亚精胺，它们能和二价阳离子一起中和很大比例的带电 RNA（参见第 4 章第Ⅲ节 C.1）。所有的芜菁花叶病毒属病毒的稳定可部分归因于多胺，但该群体中的一些成员在分离时非常容易丢失这些组分。因此，在没有氯化铯存在的情况提纯的 BeMV 每个病毒粒体含有 100～200 个多胺分子和 500～900 个 Ca^{2+}。这些多胺很容易被其他阳离子（如 Cs）调换，从而导致粒子失去其稳定性（Savithri *et al.*，1987）。

c. 豇豆花叶病毒属病毒

豇豆花叶病毒在中和带电磷酸盐方面与 TYMV 相似，因为含有 RNA 的粒子也含有多胺，但是没有证据表明存在可活动的蛋白臂（Virudachalum *et al.*，1985）。

第Ⅶ节　更复杂的等轴病毒

1. 植物呼肠病毒属（*Phytoreovirus*）

植物呼肠病毒粒体有明显的棱角，直径为 65～70 nm，包含 12 种 dsRNA。典型种为三叶草伤瘤病毒（WTV）（Reddy and MacLeod，1976）和水稻矮缩病毒（RDV），它们的粒子中含有 7 种不同的蛋白质（表 6.4）。与具有三层外壳的大多数动物呼肠病毒不同，植物呼肠病毒粒体由一层外部蛋白质壳和内部含有蛋白质与 12 种 dsRNA 的核心组成。但没有与这些 RNA 紧密结合的蛋白质。在分离过程中各种物质的影响使粒子很容易被破坏。在合适的条件下可形成亚病毒粒体，它缺少外部的衣壳并且暴露出在二十面体的五重旋转轴顶角处的 12 个突出物。

通过控制降解并研究其产物，已可以确定某些蛋白质在粒子内的定位。如果温和处理（如酶消化）除去外部的衣壳，得到的内部核心部分没有削弱其侵染介体昆虫单层细胞的能力（Reddy and MacLeod，1976）。

利用小角度中子散射的方法研究了 RDV 内 RNA 的定位（Inoue and Timmins，1985）。RNA 定位在半径 23 nm 的范围内，蛋白衣壳处于离粒子中心 23～36 nm 的位置。因此没有出现 RNA 与蛋白质间的大量的渗透。人们也已经明确了病毒 RGDV 内蛋白质的定位（Omura *et al.*，1985）。

利用冷冻电子显微镜和图像重建的方法，Lu 等（1998）推导出分辨率为 25 Å 的 RDV 结构。它显示了两个明显的二十面体衣壳：$T = 13$ 的外部衣壳直径为 700 Å，由 260 个 P8（46 kDa）的三聚体组成；$T = 1$ 的内部衣壳，直径为 567 Å、厚度为 25 Å，由 60 个 P3（114 kDa）的二聚体组成（图 5.38）。在倾斜试验（tilt experiment）中，外部衣壳表现为左手手性（$T = 13l$）。$T=1$ 核心在 $T = 13$ 外部衣壳结构的准等价的组织中起着关键作用（Wu *et al.*，2000）。这表明核心（core）可能指导外部衣壳的装配。

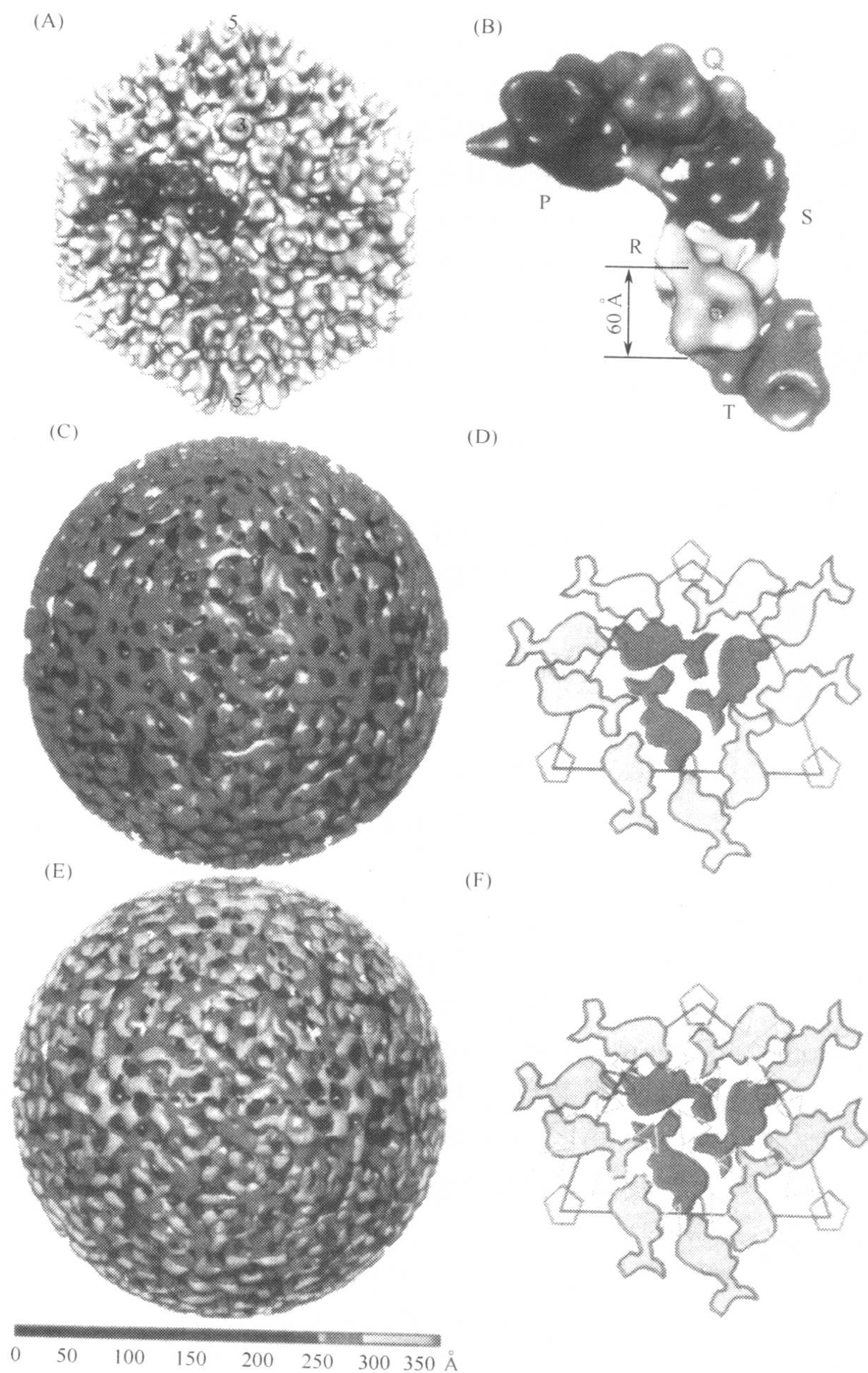


图5.38（见彩色图版5.6）RDV的结构。（A）沿二十面体的二重轴观察重建的完整RDV的颜色深浅不同的表面图。数字5、3和2分别标明了二十面体的五重轴、三重轴和二重轴。颜色突出的部分是发现于每个非对称单位的一组相邻的5个三聚体。（B）从（A）图经计算提取出的5个三聚体组的放大图。这些三聚体在不同的准等价位置用针对BTV的常规名称分别称为P、Q、S、R和T（Grimes *et al.*，1997）。（C）在590 Å直径处经计算提取出的内衣壳，显示$T=1$的晶格（lattice）。虚线的三角形标明了二十面体的一个三角面（triangular face）。（D）在一个显示$T=1$的晶格的三角形中的鱼形密度分布（fish-shaped density distribution）示意图。（E）在直径604 Å处经计算提取出的衣壳，显示外衣壳（黄色）和内衣壳（蓝色）的接触面。彩色标尺显示作为半径功能的彩色编码。（F）表明外层壳的三聚体（黄色三角形）与内层壳的鱼形密度的互作方式的示意图。经允许，引自Lu等（1998）。

Mizuno 等（1986）给出电子显微观察的证据，认为 RDV 中的双链基因组 RNA 片段与蛋白质复合形成超螺旋结构形式被包裹在病毒的核心中。

2. 斐济病毒属病毒

斐济病毒属（*Fijivirus*）病毒在直径为 62～70 nm 的球状粒子中含有 10 种 RNA。斐济病毒与植物呼肠病毒属病毒（phytoreoviruses）的类似之处是都有两层衣壳，不同的是它在外部衣壳（A 型刺突）和内部衣壳（B 型刺突）上都具有刺突。

MRDV 是斐济病毒属中研究最多的成员（Milne and Lovisolo，1977）。Milne 等（1973）发现有 12 个 A 型刺突从完整的 MRDV 粒子表面突出，在每个五重对称轴上各有一个刺突。这些刺突长 11 nm。在每个 A 型刺突下都有长为 8 nm 的 B 型刺突，当去除外部蛋白质时它们会暴露出来。B 型刺突与在内核中称为基片(板)(baseplate)的一些分化的结构相关联。离体的 B 型刺突是由围绕一个中心孔的 5 个形态亚基构成的。

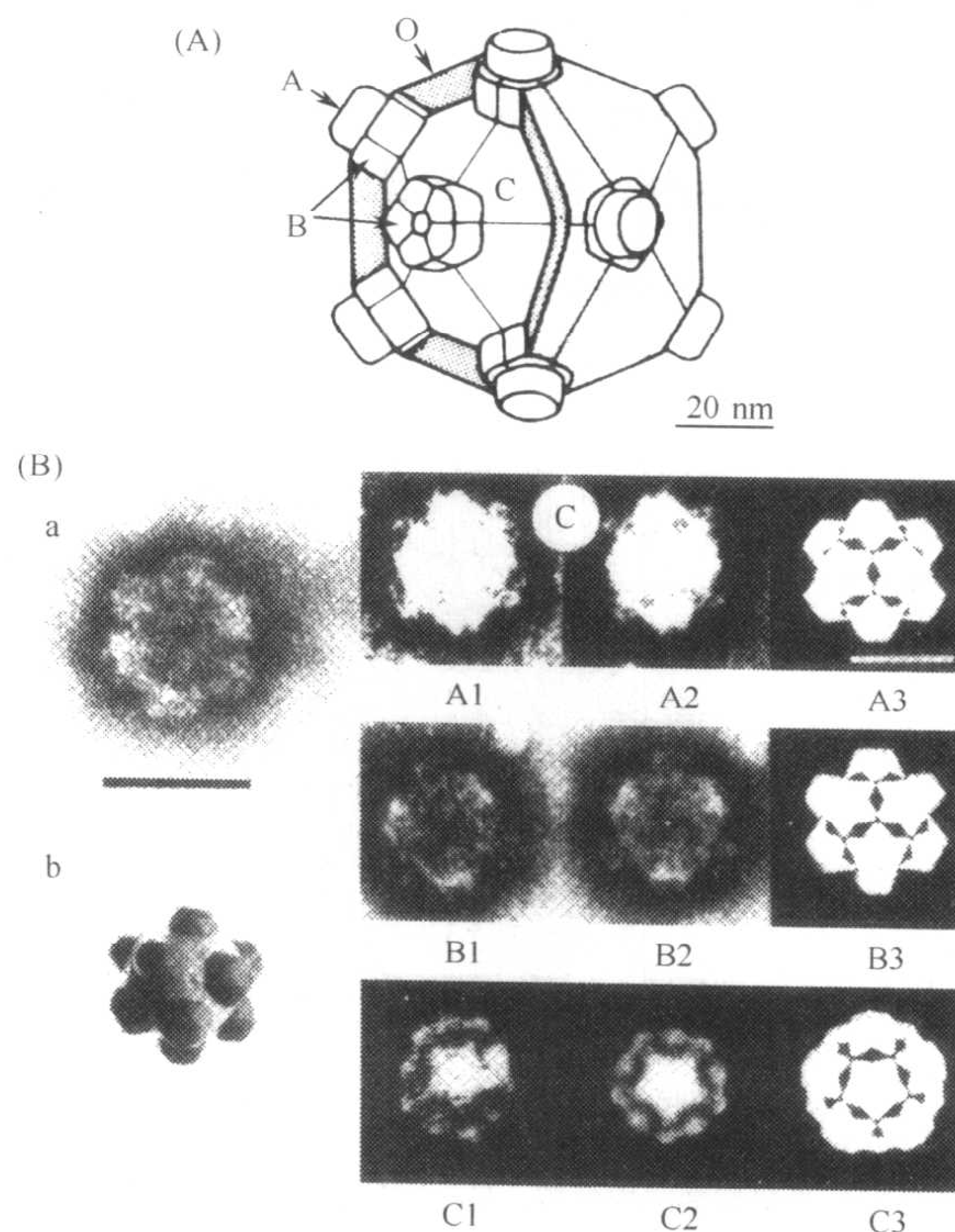


图 5.39 （A）甘蔗斐济病毒（Fiji disease virus）的比例模型。粒子的部分外部衣壳（O）和一个 A 刺突已经被去掉以暴露出核心（C）以及 B 和 A 刺突的结构与排列。A 刺突内、外衣壳与核心的不同形态亚基的排列尚不清楚。承蒙惠允，引自 Hatta 和 Francki（1977）。(B) RRSV 的结构。(a) RRSV 的电子显微照片；(b) RRSV 粒子的示意图；(c) 病毒的显微照片显示二重轴、三重轴和五重轴对称（分别标为 A1、B1 和 C1），同一个图像旋转 180°（A2）或 120°（B2）或 72°（C2），即可得到二重轴、三重轴和五重轴对称的推定模型（分别为 A3、B3 和 C3）。经允许，引自 Mertens 等（2000）。

没有刺突的核心（光滑核心）含有 136 kDa 和 126 kDa 两种多肽。具有刺突的核心还另外含有一种 123 kDa 的多肽，它可能位于 B 型刺突上（Boccardo and Milne，

1975)。在粒子的负染图像中尚未发现其他多肽与特定结构有任何明确的关系（Boccardo and Milne，1975；Luisoni *et al.*，1975)。用电子显微术发现 FDV 的结构与 MRDV 的非常相似[图5.39(A)]。

3. 水稻病毒属病毒

水稻病毒属（*Oryzavirus*）成员病毒粒体直径为 57～65 nm，含有 10 种双链 RNA。它们的粒子结构与其他两种植物呼肠病毒属的病毒有明显的差异，因为水稻病毒属病毒没有外部衣壳，只由内部核心组成。它有 12 个 B 型刺突，长 8～10 nm，底部宽 23～26 nm，顶部宽 14～17 nm[图5.39(B)]。

第Ⅷ节　有包膜的病毒

A. 弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）

弹状病毒科病毒成员可以侵染脊椎动物、无脊椎动物和植物。它们具有复杂的结构。弹状病毒形成非常不同的生物体，图 5.40 展示了它们基本的装配图。

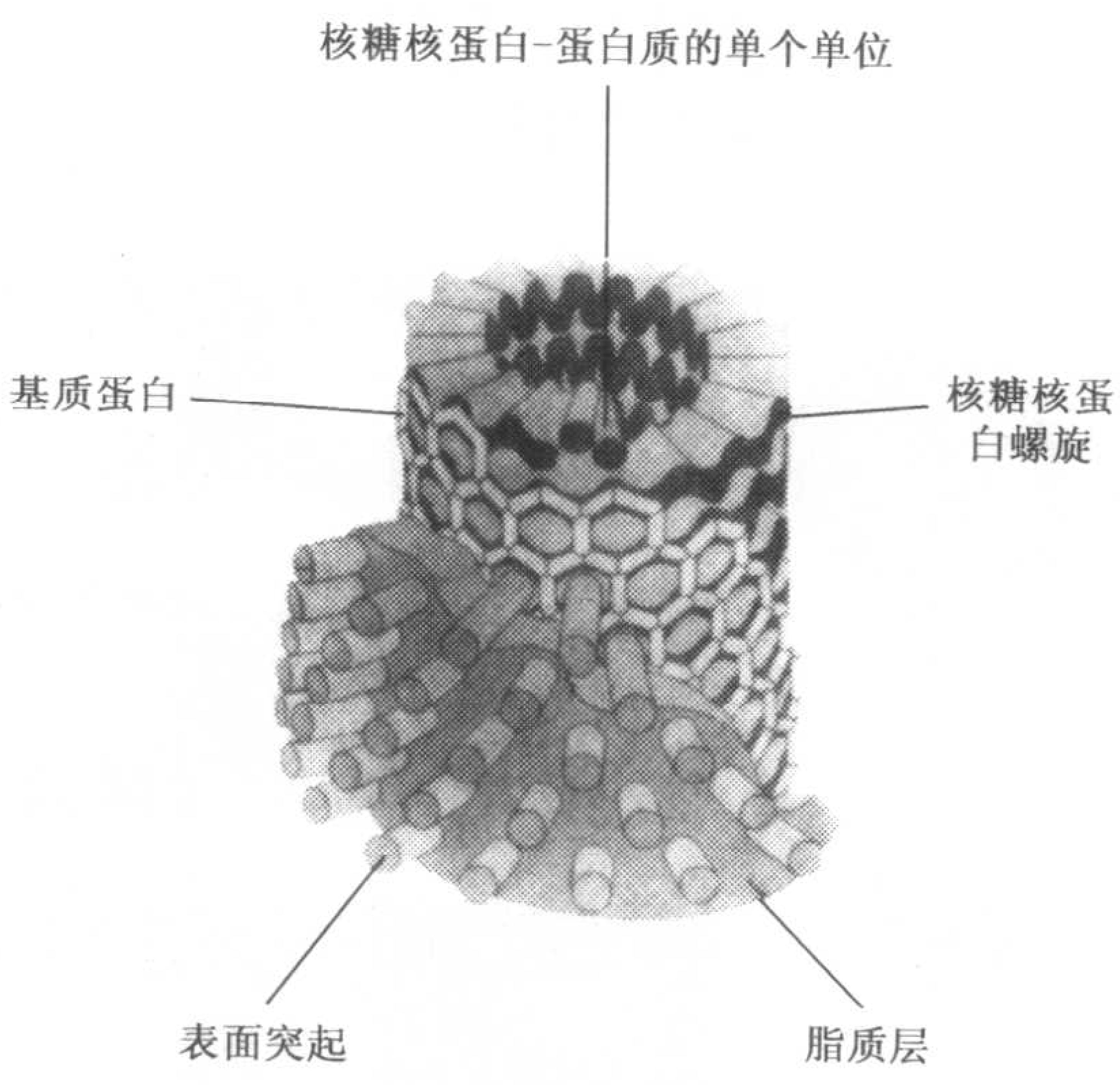


图 5.40　弹状病毒结构模型，显示三种蛋白质和脂质层之间推定的三维空间关系。经允许，引自 Cartwright 等（1972）。

一些动物弹状病毒可能为子弹状，但是大多数甚至全部的侵染植物的成员两头都是圆头的，形成杆菌状。利用超薄切片和负染电子显微镜观察测定了粒子大小和细微结构（图 5.41）。粒子的大小只能大约估计，而且可能低估，因为在电镜观察过程中脱水步骤会使粒子缩小。如果 pH 和其他条件不精密地控制，在体外病毒粒体很容易变形和破碎（Francki and Randles，1978）[图 5.41（E)]。

人们用分级分离亚病毒结构、利用酶或去污剂处理逐步剥离位于表面的蛋白及以带有^{125}I 标记暴露的蛋白质的方法确定了各种病毒蛋白在粒子内的位置（Ziemiecki and

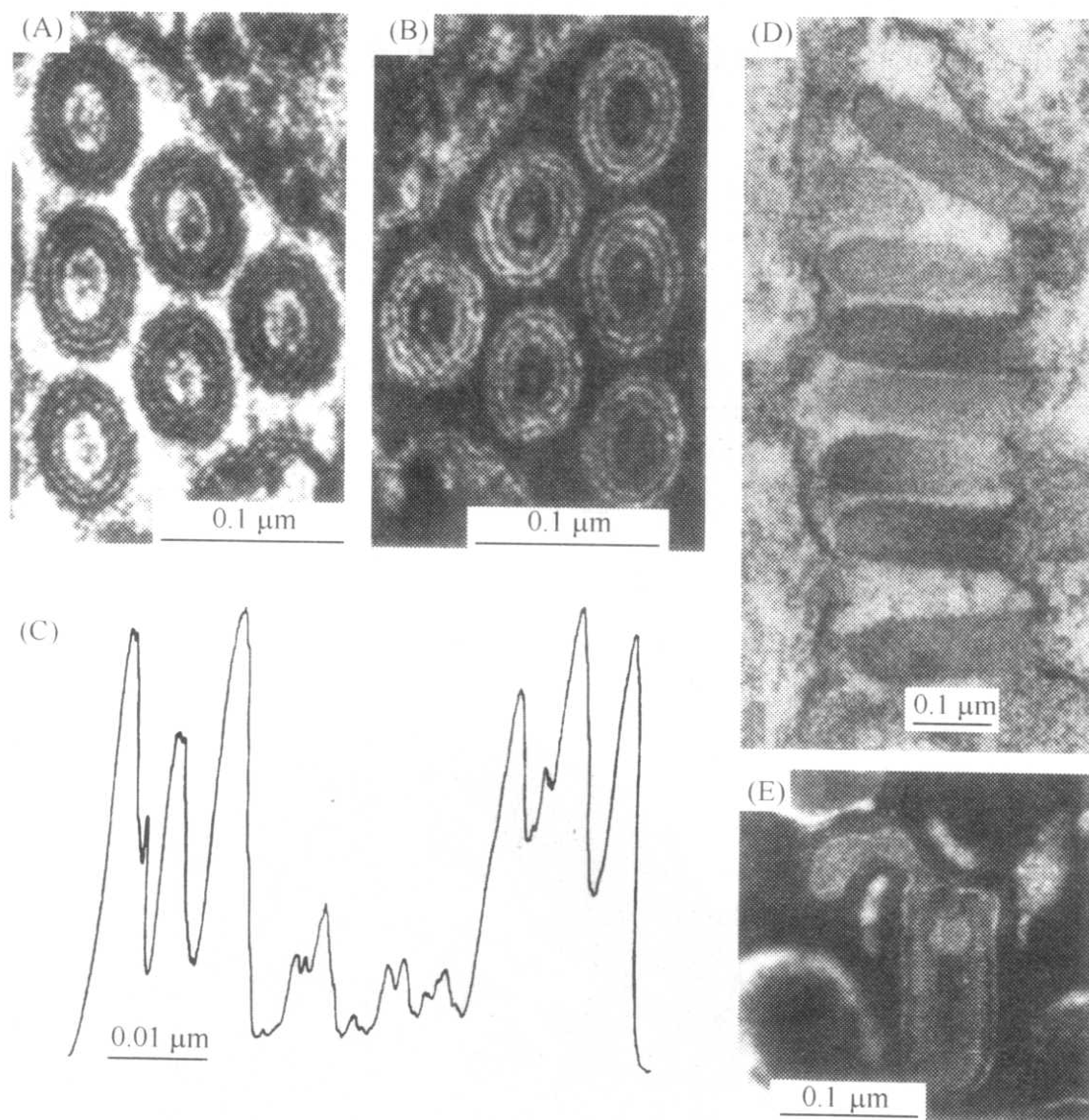


图 5.41 弹状病毒科病毒（rhabdoviruses）。(A) 和 (B) 马铃薯黄矮病毒粒体的横切面显示病毒包膜（viral envelope）的片层性质。粒体表现出其侧面受到的挤压。(B) 是 (A) 的反转照片。(C) 用微光密度计对 (A) 图上部第一个病毒粒体的分析结果。承蒙惠允，引自 MacLeod 等（1966）。(D) 光叶烟（*N. rustica*）细胞超薄切片显示存在于一个膜被小泡（membrane-bound vesicle）内的一组马铃薯黄矮病毒粒体。承蒙 R. MacLeod 提供照片，谨致谢意；(E) 叶滴制备物（leaf dip preparation）负染的苦苣菜黄脉病毒粒体。经允许，引自 Richardson 和 Sylvester（1968）。

Peters，1976）。N 蛋白与 RNA 紧密结合，形成核糖核蛋白核心（RNP）。在超薄切片中可看到它有间隔 4.5～5.5 nm 的横纹。RNP 是一股完整连续以螺旋状方式排列的蛋白质（Hull，1976a）。外囊膜具有两种蛋白质：按六角形排列的基质蛋白或 M 蛋白和形成突起物的 G 蛋白（糖蛋白）(Ziemiecki and Peters，1976)。

更精细的结构还有待于进一步研究。特别是，人们还不了解六角形排列的 M 蛋白在空间上是怎样与螺旋状 RNP 相作用的。同样地，圆头的形成和内部 RNP 的排列也还没确定。Hull（1976a）认为 M 蛋白层和 G 蛋白的排列基于与其他杆菌状病毒一样的半个二十面的圆头。

B. 番茄斑萎病毒属病毒

番茄斑萎病毒很不稳定、不易提纯（Joubert *et al.*，1974）。人们研究了被侵染细胞的超薄切片内和粗提纯物中的病毒结构。提纯物中有许多变形的和破损的粒子。

番茄斑萎病毒粒体为直径 80～110 nm 的球体，脂质外膜内包裹着基因组 RNA，RNA 与 N 蛋白结合形成核蛋白复合物。粒子中也包含了病毒聚合酶。脂质包膜含有两种糖蛋白（图 5.42）。

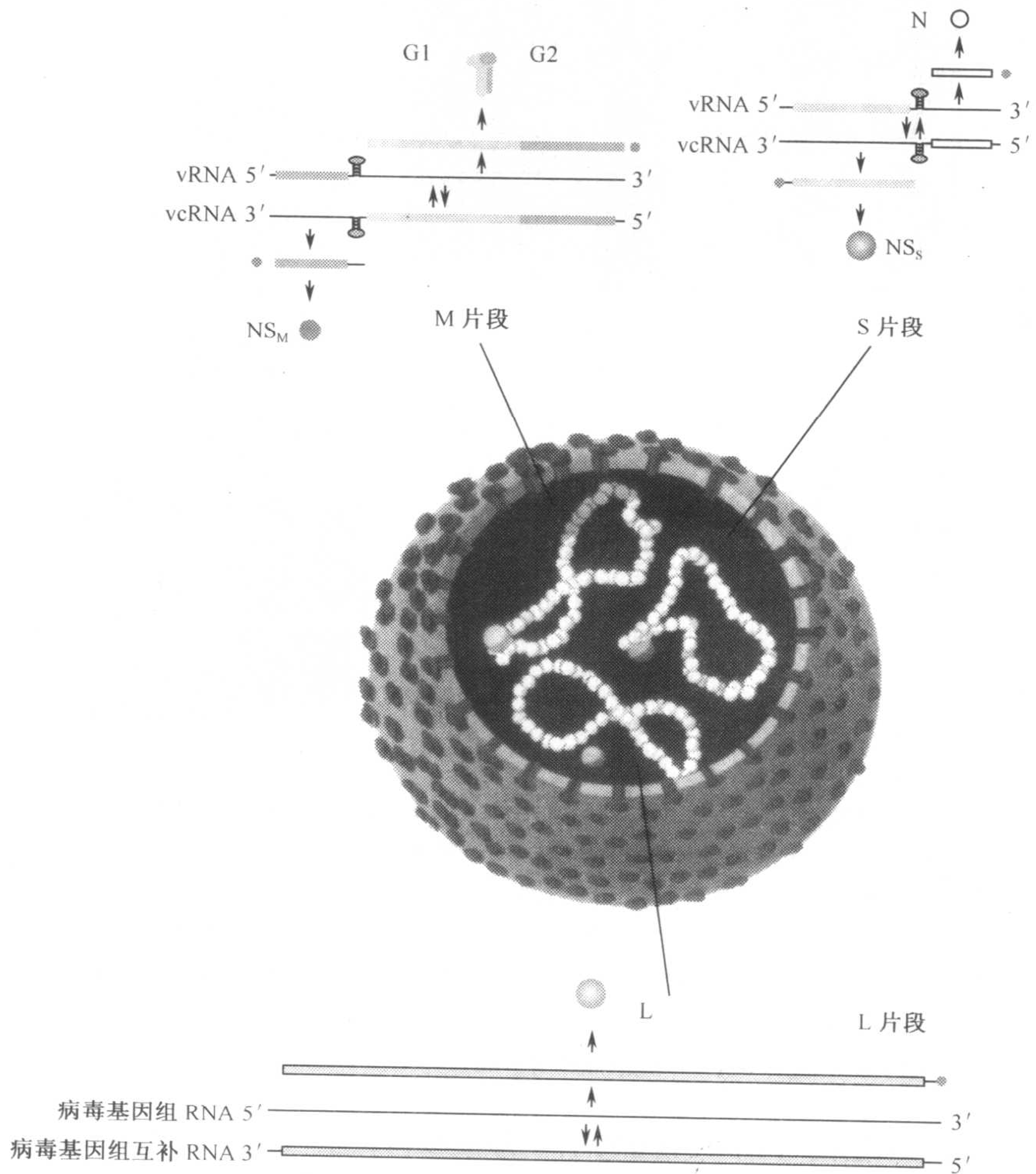


图 5.42（见彩色图版 5.7）TSWV 的形态和基因组表达。TSWV 粒子核心由三种病毒片段与核蛋白（N，白色）紧密相连，病毒编码的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（L，黄色）附于其上。病毒粒体包装在一种囊膜内，膜上存在两种糖蛋白（G1 和 G2，分别标为红色和蓝色）。双义 M 和 S 片段各以病毒的 RNA（vRNA）和互补 RNA（vcRNA）链编码两种蛋白质，而 L RNA 只编码一个大的 L ORF。所有病毒蛋白都从 mRNA 翻译产生，转录是通过从寄主 mRNA 抢帽（cap snatching）起始的（以黑点表示）。糖蛋白 G1 和 G2，来源于前体蛋白的切割；NS_s（紫色）和 NS_m（绿色）为非结构蛋白。双箭头表示复制，而单箭头表示转录和翻译。承蒙版权所有者（Elsevier Science）的惠允，引自 Prins 和 Goldbach（1998）。

第Ⅸ节　二十面体病毒的装配

A. 雀麦花叶病毒科病毒

Bancroft 及其同事的开拓性研究表明，一些雀麦花叶病毒属病毒的蛋白亚基在体外

可以重组成多种的结构（Bancroft and Horne，1977）。在病毒 RNA 存在的情况下，蛋白亚基可以重组成与野生病毒一模一样的粒子。然而，所用的条件在一些方面是非生理的条件。CCMV 的装配机制可能涉及羧基和羧酸酯配对（carboxyl-carboxylate pairs）（Jacrot，1975）。

在温和的条件下有侵染性的 CCMV 的装配可能与体内的装配机制相关（Adolph and Butler，1977）。一个 3S 蛋白质在 25℃、pH 6.0 并且离子强度为 0.1～0.2 时可聚集成二聚体，在没有外加的 Mg^{2+} 存在时能与 RNA 结合形成有侵染活性的病毒。无论用物理化学还是结构学方法研究都不能区别重组的病毒粒体和自然的粒子。

Cuillel 等（1979）利用各种外源 RNA 做的竞争实验表明，在适当的条件下 BMV 的蛋白质在一定程度上能够识别自己的 RNA 分子。用中子和 X 射线扫描，Cuillel 等（1983）发现 BMV 的空蛋白衣壳在体外装配的过程很快，前向散射到达最大值的一半所用时间少于 1s。寡聚核苷酸 $(AP)_8A$ 和 $(A\text{-}T)_5$ 可以与 CCMV 空外壳相结合，而且特异地与衣壳中多肽链 N 端臂上的精氨酸和赖氨酸结合（参见第Ⅵ节 B.4.b）。这种结合的研究支持一种病毒装配的模型，即认为在装配过程中由于碱性氨基酸侧链被中和，诱使无规则的卷曲转变为 α 螺旋（Vriend *et al.*，1986）。

对 BMV 和 CCMV 的各种体外研究表明，外壳蛋白中高碱性的 N 端区域参与了与病毒 RNA 的互作，对 BMV 外壳蛋白基因片段已知序列缺失的突变株的研究进一步证实了上述结论。最前的 7 个氨基酸对体外 RNA 的装配完全没有必要，但是如果缺失 25 个 N 端的氨基酸，则不能进行粒子的装配（Sacher and Ahlquist，1989）。对 BMV 进行诱导突变研究清楚地表明在体内 N 端臂和 3 个基因组 RNA 之间存在互作（Choi *et al.*，2000）。例如，在富含精氨酸的结构（ARM）中发生缺失可明显地影响含 RNA 1 病毒粒体的稳定性。ARM 区域中还存在对于不受基因组 RNA 3 约束的 RNA 4 的装配很重要的氨基酸。

尽管 BMV 和 CCMV 在结构和遗传方面都很相似，但是在病毒外壳蛋白包裹同源核酸方面存在专化性（Osman *et al.*，1998）。构建了将两病毒的外壳蛋白基因互换的 RNA 3 嵌合体，在本生烟的原生质体中检测它们的复制能力，并且在昆诺藜和本生烟中检测它们系统侵染的能力。每种嵌合体的复制水平与野生型接近，并表达了预期的外壳蛋白。但是，CMV 外壳蛋白包裹 BMV RNA 的水平远远低于野生型。BMV 的外壳蛋白则不能包裹异源的 CMV RNA。因此，在体内 BMV 外壳蛋白的包装比 CMV 更具特异性（Osman *et al.*，1998）。

BMV 的外壳蛋白在体内可以形成两种明显不同的衣壳（Krol *et al.*，1999）。自然的 BMV 基因组 RNA 包裹于 $T=3$ 的含 180 个亚基的粒子内，只含 BMV 外壳蛋白基因的人造 mRNA 则被包裹在含 120 个亚基的粒子中。120 亚基粒子由 60 个外壳蛋白二聚体在明显的非平衡条件下组成，不同于在准平衡的条件下形成 180 亚基的粒子。因此，RNA 的特性对外壳蛋白亚基间相互作用的增强方面具有潜在的适应性。

B. 苜蓿花叶病毒

苜蓿花叶病毒的外壳蛋白装配成含有核酸的杆菌状粒子或不含核酸的 $T=1$ 的二十面体粒子（Hull，1970c；Driedonks *et al.*，1977；Bol and Kruseman，1969）。Driedonks 等

(1980) 通过分析离心推测聚合作用。他们推测病毒的装配分 4 个阶段：①起始阶段；②最初帽子的形成；③圆柱的延伸；④帽子的形成或中止阶段。外壳蛋白的二聚体在溶液中结构很稳定（Driedonks *et al.*，1977），并且可能参与病毒装配。$T=1$ 粒子的 X 射线晶体学研究表明一个亚基的 C 端臂与邻近的亚基的 N 端臂勾缠在一起形成二聚体（Kumar *et al.*，1997）。形成二聚体的能力由外壳蛋白 C 端控制（Choi and Loesch-Fries，1999）。

C. 其他病毒

低离子强度条件下，分离的 RNA 和外壳蛋白在体外可以装配成 SBMV 粒子。由各种组分形成 $T=1$ 或 $T=3$ 粒子结构依赖于所用的病毒 RNA 的大小和 pH（Savithri and Erickson，1983）。SBMV 豇豆株系（现称为 SCPMV）的外壳蛋白与病毒 RNA 上的特定位点结合（Hacker，1995）。这一区域已定位到 1410～1436 个核苷酸序列，并预测可折叠成一个带有一个 4 个碱基环和一个含 24 个碱基的双链茎构成的发夹结构。

TCV 在高 pH 和离子强度时发生解离，可产生外壳蛋白二聚体和由基因组 RNA、6 个外壳蛋白亚基和一个共价结合的外壳蛋白二聚体 80 kDa 蛋白质所组成的核蛋白复合体。外壳蛋白和自由的 RNA 或核蛋白复合体在体外可以重组成 TCV 粒子。对于两种 RNA 形态，粒子装配过程对病毒 RNA 具有可选择性，并以一个最初结构开始进行衣壳的连续伸长（Sorger *et al.*，1986）。分析各种突变病毒 RNA 的包装发现，在外壳蛋白基因 3′端带有一个 28 个核苷酸的突出发夹环结构的 186 核苷酸区域对于 TCV 的 RNA 包装是必需的（Qu and Morris，1997）。

OkMV 在接种的黄瓜子叶中可产生大量的空病毒蛋白衣壳（Marshall and Matthews，1981）。接种一天后，大约有一半的病毒蛋白外壳存在于细胞核中。只有当细胞质中含有病毒粒体时，这种积累才能发生。对这种主动、优先的积累作用最有可能的解释是，病毒外壳蛋白以单体、五聚体或六聚体的形式进入细胞核内并立刻装配成衣壳。

利用杆状病毒载体在草地夜蛾（*Spodoptera frugiperda*，sf21）细胞中共表达 CPMV 编码大小两种外壳蛋白的 RNA 2 各区域，可以形成具有空粒子沉降特性的类似病毒粒体（Shanks and Lomonossoff，2000）。但是，当两种外壳蛋白分别表达时，则不能形成粒子。同样地，在原生质体中表达 CPMV 的蛋白质（Wellink *et al.*，1996）和在转基因植物与昆虫细胞中表达的 ArMV 的蛋白质（Bertioli *et al.*，1991）都可形成类似病毒的粒子。

水解 CPMV 的小外壳蛋白会导致 C 端 24 个氨基酸丢失（Taylor *et al.*，1999）。将含有 CPMV 缺失小外壳蛋白 C 端 24 个氨基酸的 RNA 2 cDNA 突变体进行侵染，它的侵染力在病毒积累过程中减弱，导致不含 RNA 的顶部粒子比率增加（73%）。这说明小外壳蛋白的 C 端区域参与了 RNA 的包装。

TYMV 尚未能在体外以 RNA 和蛋白亚基重新装配成粒子（Taylor *et al.*，1999）。图 5.43 所示为 TYMV 体内装配的一个可能模型。

Matthews (1981) 对此进行了更详细的讨论。该模型认为，在病毒装配开始之前存在外壳蛋白的积累过程，但和 TMV 的复制不一样，不存在完全没被包装的病毒基因组的积累过程。当膜上的五聚体和六聚体都用完了，来自电子透明层的其余外壳蛋白可作为补充直到用完为止。在没有 RNA 的情况下，推测空的蛋白外壳可能是在病毒装配

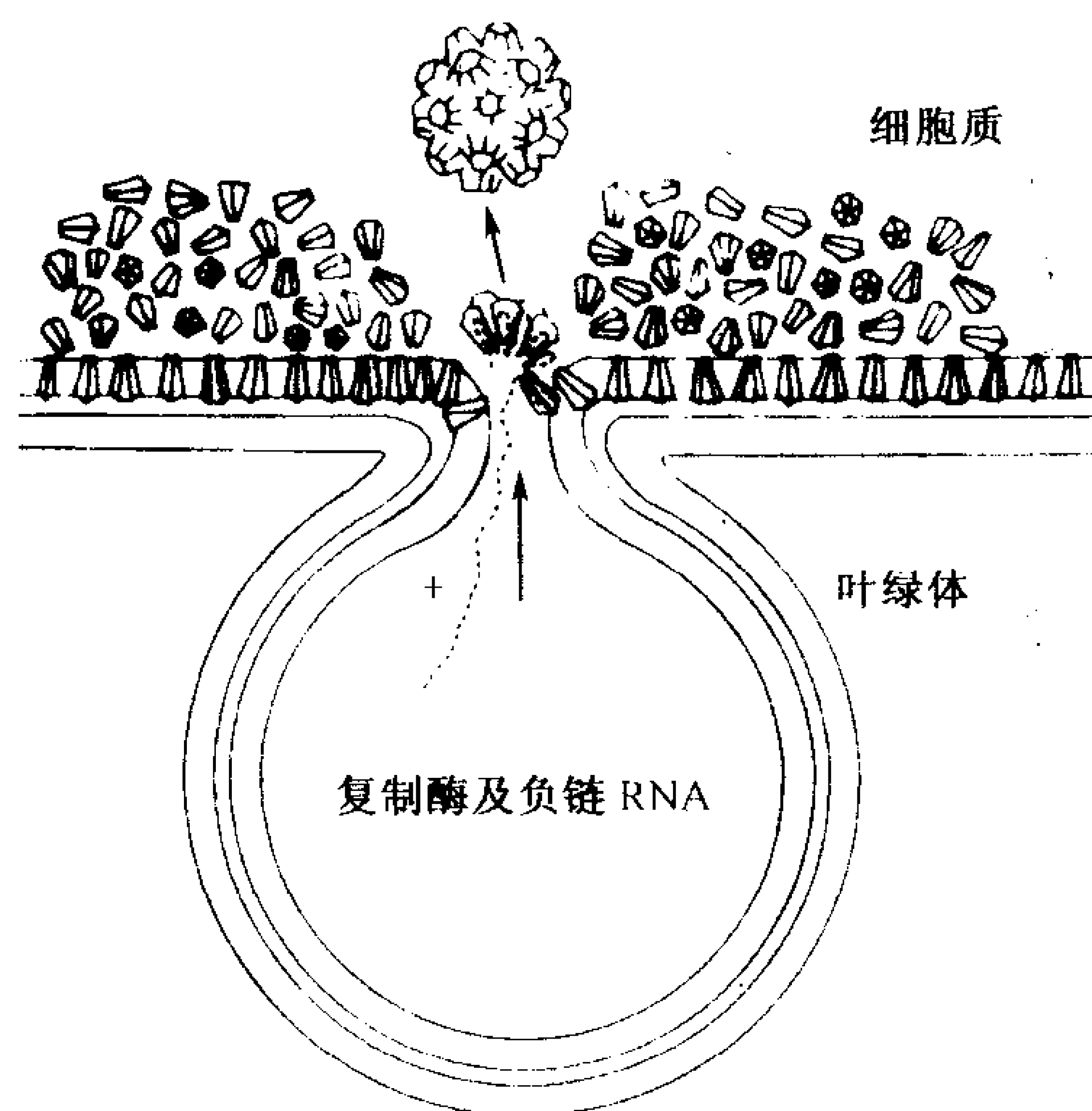


图 5.43　TYMV 装配的模型。① 外壳蛋白亚基的五聚体和六聚体在 ER 附近合成并在细胞质内积累，并过量覆盖在叶绿体群生小泡（vesicle）上；② 这些聚集蛋白以一种定向的方式插入叶绿体外膜，即通常埋藏于完整蛋白衣壳内的疏水一端位于脂双层膜内，通常在病毒粒体内部的一端位于膜的表面；③小泡内一个合成的或正在合成的 RNA 链开始穿过小泡的茎部；④ 在茎部，RNA 上一特定的核酸序列识别并结合位于叶绿体外膜小泡茎部附近的一具有五聚体表面特征的结构，因而起始病毒的装配；⑤ 装配通过加入来自于膜上未定向的五聚体和六聚体得以延伸；⑥完整的病毒粒体被释放到细胞质内。引自 Matthews（1991）。

时出错形成的。这些空粒子的形成是由于这种病毒衣壳上存在很强的蛋白质与蛋白质间互作的原因。

该模型还可清楚地解释在 TYMV 复制中 2-硫脲嘧啶的作用。当小泡中基因组 RNA 的合成受类似物的抑制时，从已累集的外壳蛋白或从先前存在的外壳 mRNA 进一步合成更多的外壳蛋白可以形成更多的空蛋白衣壳（Rohozinski and Hancock，1996）。该模型也解释了光照对病毒装配的明显要求。其认为，光诱导产生低 pH 可以推进 TYMV 的装配。

D. 植物呼肠病毒装配过程中 RNA 的选择

每个 WTV 粒子都含有每个基因组片段的一个拷贝。由以下两点可以看出：①从病毒中分离的 RNA 每个片段都有等摩尔的数量（Reddy and Black，1973）；②单个粒子都可成功侵染（Kimura and Black，1972）。因此，对于这种病毒存在一个重要的问题：在病毒装配的过程中存在什么大分子信号使得病毒的 10 个或 12 个基因组片段一个个地都进入到每个粒子内？例如，在装配 WTV 的 12 个基因组片段时可能涉及 12 种不同的蛋白质-RNA 或 RNA-RNA 的相互作用。针对该问题的第一个证据来自 Anzola 等（1987）对 WTV 的研究结果。他们构建了一个缺损（DI）的基因组片段 5，它缺失了内部的一大片段，只有有功能片段 5（S5）的 1/5 长。但是和正常序列一样，在每个粒子中都含有此 DI RNA 的一个拷贝。因此，他们认定参与包装的序列一定处于正链 5′端的 319 个碱基对和 3′端的 205 个碱基对中。Reddy 和 Black（1974，1977）研究显示在病毒群体中增加 DI RNA 的比例可以导致正常片段的摩尔比例相应地降低，也就是

说 DI 片段只与其亲本病毒的分子竞争。因此必定有两个识别信号，一个是识别病毒而不是寄主的基因组片段，另一个是识别 12 个片段的每个拷贝。

Anzola 等（1987）测定了所有 12 个基因组片段 5′端和 3′端的序列（图 8.21）。他们提出在 5′端一个非常保守的六核苷酸序列和 3′端的一个非常保守的四核苷酸序列可能形成针对病毒有别于寄主 RNA 的识别信号。他们还发现只在保守的序列中存在片段特异的长度可变的反向重复序列（图 8.22），这可能是各个基因组片段识别的特异序列。在 RDV 的基因组片段 9 中也发现了类似的反向重复序列（Uyeda *et al.*，1989）。

呼肠病毒科的其他成员都存在 5′端和 3′端的保守序列（Asamizu *et al.*，1985）。含有分段的单链 RNA 基因组的流感病毒在每个片段的 5′端和 3′端也有相对保守的序列（Stoeckle *et al.*，1987）。这些相似性进一步加强了 5′端和 3′端序列在片段化基因组 RNA 的包装过程中起作用的论点。但是这个问题还没完全解决，如果只涉及 RNA 和 RNA 的互作，那么怎样使这一套 12 个 dsRNA 进行装配？如果蛋白质与 RNA 间的识别重要，由已知病毒核蛋白质核心中的三种蛋白质如何形成 12 个特异的位点？

在呼肠病毒中，负链是由病毒的复制酶以正链为模板合成的。该模板与微粒组分相关（Acs *et al.*，1971）。依据这些结果和相关结果，有人认为 dsRNA 的形成是在装配中的病毒粒体的初生核心中进行的，且 dsRNA 仍留在这些粒子中。如果是这样，这种机制无疑适用于植物呼肠病毒。这意味着引导正确无误的一套 12 个基因组 RNA 进行选择的机制涉及正单链 RNA。因此，图 8.22 所示的碱基配对的反向重复应是包装的识别信号。其他病毒编码的短暂存在于形成中的病毒核心中的“脚手架”蛋白可能参与 RNA 的识别，这种识别可能超过或等同于成熟粒子中的那三种蛋白质。

Xu 等（1989b）构建了一系列转录载体，可产生 S8 RNA 的正确转录物以及 4 个只在紧靠 3′端有差异的类似物。他们的实验从三条路线证实了 5′端和 3′端结构域功能上相互作用：①核酸酶 T1 实验表明 3′端微小的改变可以影响 5′端的构造；② 改变 3′端以扩大潜在的 3′与 5′碱基配对可以略微降低体外翻译，减少潜在的碱基配对可以提高体外翻译；③用计算机模型分析 6 个 WTV 转录物的最低能量的结构时预测到末端反向重复存在碱基配对的构型。

Dall 等（1990）建立了凝胶阻滞测定，并发现从被侵染叶蝉细胞组织的提取物一组分能选择性结合 WTV 转录物。利用末端修饰和内部缺失的转录物，他们确定了存在于末端区的反向重复序列对最优的结合是必需的但不是足够的。涉及的一些内部序列也是必需的。还没有用来区分来自不同片段的转录物间的结合的实验证据。受侵染细胞提取物中存在，而健康细胞提取物中没有的结合组分尚未得到鉴定。

第Ⅹ节　讨论与结论

随着计算机容量、速度和效率的提高，非晶体对称均衡的利用和计算机制图法的发展使一些杆状和等轴植物病毒的外壳蛋白和蛋白衣壳的精细结构图的分辨率达到原子水平。当然，X 射线晶体分析只能应用于可获得晶体的病毒或病毒外壳蛋白。对于不能获得晶体的较大病毒可以用其他的方法，特别是电子显微镜方法，它们在研究病毒结构中仍起很大的作用。

血清学方法甚至使用单克隆抗体进行研究，但在研究描绘小植物病毒的结构中有其使用的局限性，这是因为结果不能做出清楚的判断，除非抗体与已经用其他方法确定的蛋白质结构相关。

Caspar 和 Klug 在 1962 年提出的关于 $T>1$ 的二十面体蛋白衣壳中亚基间结合作用的准等价的观点依然很有用，但根据后来的发展已需要进行修正。之前已经提到，该理论甚至适用于 $T=1$ 对称粒子亚基的构成（Chapman，1998）。病毒至少可以通过两种方式进化，这两种方式可以避免在不同对称相关条件下亚基间结合所存在的高比例的潜在非等价的情况：①通过在不同的对称相关的位置具有完全不同的蛋白质，如呼肠病毒和豇豆花叶病毒；②通过蛋白亚基形成能灵活地适合不同对称位点的两个或更多结构域，如 TBSV 和 SBMV。

等轴病毒的结构的高分辨率分析研究已经表明，尽管衣壳外部表面表现为准等价二十面体对称结构，但可能还没扩展到内部。特别是多肽链的 C 端区域频繁的交织缠绕形成了一个内部的网络。

病毒内核酸上的许多带负电的磷酸基团相互排斥。只有将所有或大部分的基团电荷中和才能形成足够稳定的病毒粒体。在原子水平的研究结构提供了三种解决这个问题的方法：①在 TMV 中，RNA 被束缚在蛋白亚基形成的螺旋结构内，每个蛋白亚基相连的两个磷酸基团靠近精氨酸残基。而 RNA 和蛋白质间的静电作用被认为是两个静电表面间的补充。其他杆状病毒也可能具有相似的排列方式，但是没有得到这些病毒更详细的数据。②在 TBSV 和其他二十面体病毒成员中，一个带有组蛋白类似物质的碱性氨基酸臂伸向病毒的内部，与 RNA 磷酸基相互作用。其余的磷酸基由二价金属离子特别是 Ca^{2+} 中和。③在 TYMV 中，RNA 和蛋白质间基本没有相互渗透，RNA 的磷酸基由多胺和 Ca^{2+} 中和。

利用 X 射线分析已确定 Ca^{2+} 在一些病毒衣壳中蛋白亚基间的特定位置。所有这些详细的结构信息在解释各种病毒稳定性对诸如螯合物、pH 与离子强度的改变等因子间的相互关系方面已有所进步。

有些由几层蛋白质组成的病毒粒体结构更为复杂，各层间的相互作用的有关证据不断增加。很可能是这些相互作用引导相邻层间的蛋白亚基的结构排列。

二十面体病毒粒体内核酸的结构很难研究，因为核酸对晶体内病毒粒体的定向排位没有影响。但是用间接的方法发现核酸在病毒体内的排列高度有序，大多数病毒 RNA 有很牢固的双螺旋结构。对于一些病毒来说，已有数据表明 RNA 的结构与二十面体对称有关。由此可以得出那些首先用多胺或二价阳离子中和电荷的病毒中，这种强的二级结构对于小等轴结构要求的致密性是很重要的。在最简单的病毒 STNV 中，中子衍射数据显示多数 RNA 分子在蛋白衣壳内排列成等轴的网状结构。从 BPMV 的高分辨率图中可以看出，约 20%的 RNA 在蛋白衣壳内遵循二十面体的排列方式。

利用定点诱变的方法，人们又发现了很多涉及杆状和二十面体状病毒的结构和稳定性的相互作用。这一发现揭示了相互作用的复杂性，这种相互作用使得病毒基因组在寄主间传递时具有足够的稳定性，也能使基因组在进入细胞时释放出来。应用电子能量损失光谱学（electron energy-loss spectroscopy）等新的技术将非常有望获得有关这类相互作用更为精细的认识（Leapman and Rizzo，1999）。

第6章 基因组组构（结构）

第Ⅰ节 导言

近10年来的一个重要特征就是植物病毒基因组序列数据的激增（explosion of sequence data）。第一个被测序的基因组是CaMV的DNA（Franck *et al.*，1980），随后是TMV的RNA（Goelet *et al.*，1982）。至1990年，已确定了属于大约20个组的40种左右病毒的基因组序列（其中一些组已经被重新分类）。在2000年，包括大多数植物病毒属的典型种在内的250种病毒基因组的序列已测定完毕，同时也有大量的部分序列（partial sequence），主要是病毒的外壳蛋白基因。

基因组序列的大量增加使植物病毒的分类能更加精细，也让我们能更容易地将相似的种类分在不同的属中（参见第2章）。例如基于基因组组构已将花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）和黄症病毒科（*Luteoviridae*）这两个科中的多个属分开。

大量的数据使得序列间的很多比较细致入微，其细节超出本书的范围。然而，序列比对结合病毒侵染性克隆的利用为突变实验提供了宝贵的信息，有利于阐明各种基因产物和非编码区的功能。

在本章中，作者将描述病毒编码的各种基因产物，并简述表达这些产物的基因组组构。下一章将讨论遗传信息是如何从这些基因组中表达出来的。在第8章将阐述这些基因组是如何复制的。

第Ⅱ节 植物病毒基因组的一般特性

病毒基因组由编码区和非编码区组成。编码区表达一些病毒的蛋白质，这些蛋白质对完成病毒的侵染循环、在植物中移动、与寄主的互作和植株间的移动是必需的。而非编码区调控基因组的表达和复制；调控序列亦可存在于编码区。

A. 信息量

理论上讲，病毒基因组中的同一个核苷酸序列能编码12种甚至更多的多肽。在正链和负链上的各3个读框中，每个读框均可含有一个可读框（open reading frame，ORF），共产生6种多肽。一般把可读框定义为一段由AUG起始密码子开始、能够表达一个10 kDa或更大的蛋白质的序列。如果每个可读框都含有渗漏终止信号（leaky termination signal），它们就会产生第二个通读的多肽（read-through polypeptide）。在自然界，像这样的一条核苷酸序列的多重使用很可能受到很多进化上的严格约束，因为，即使一个碱基的变化都有可能影响多种基因产物。然而，两个位于不同读框的重叠基因是偶尔存在的，正如基因既可存在于正链亦可在负链上一样。通读和移码蛋白是相当普遍的，我们将在第7章（第Ⅴ节B.9部分）对其加以阐述。

在植物病毒中发现的基因数从1个（如卫星病毒，STNV）到12个［如一些长线病毒科病毒（closteroviruses）和呼肠病毒（reoviruses）］不等。大多数正单链RNA病毒基因组编码4～7个蛋白质。除此之外，基因组还包括一些对病毒复制很重要、具有识别和调控功能的序列。这些序列通常分布在单链RNA病毒的5′和3′非编码区，但也有可能存在于内部，甚至有可能是在编码序列中。

B. 基因组核酸利用的经济性

病毒十分有效地利用它们所拥有的有限的基因组核酸。真核生物基因组的内含子，可能比编码序列还要大10～30倍。像原核细胞一样，大多数植物病毒缺乏内含子，然而第7章（第Ⅴ节B.11部分）中会提到一些特例。植物病毒与其他寄主界的病毒具有其他的一些共同的特征，表明它们都有效地利用其基因组核酸：

（1）编码序列通常是很紧凑的，基因间的非编码区很少。

（2）两个不同基因的编码区，有可能以不同读框的方式重叠在一起（如BNYVV，图6.49）；或者，一个基因可能完全包含在位于不同读框的另一个基因内［如香石竹斑驳病毒属（*Carmovirus*）基因组，图6.25］。

（3）“渗漏”终止密码子的通读，会产生另一个较大的通读多肽，该多肽的氨基端与较小的蛋白质相同。该现象在单链正义RNA病毒的基因组中是很常见的。移码蛋白是核糖体通过切换到另一个读框而避开了一个终止密码子而产生的，结果与“渗漏”终止信号相似；在第7章第Ⅴ节B.10部分将对其加以介绍。

（4）一个基因产物可能有多种功能。例如，AMV的外壳蛋白有保护病毒粒体的功能，还在病毒的昆虫传播以及病毒RNA侵染的起始过程中起作用。MSV的外壳蛋白除具有保护作用外，还与昆虫传毒的特异性（参见11章第Ⅳ节D.1部分）和病毒在细胞间的运输（参见第9章第Ⅱ节D.2.i部分）、病毒DNA向细胞核的转运有关（参见第9章第Ⅱ节C部分），并且有可能与症状的表现及复制的调控有关。

（5）在一些双生（病毒科）病毒（geminiviruses）、RTBV及CaMV中已经发现了有功能的内含子（参见第7章第Ⅴ节H.1部分）。因此，mRNA的剪接能增加mRNA转录物的多样性，也就有可能增加基因产物的数量，这可能是具有DNA基因组的病毒的普遍特征。

（6）一个病毒的有功能的酶，可能由一个寄主编码的蛋白质和一个病毒编码的多肽组成（如TMV的复制酶）。

（7）调控序列可能与编码序列重叠存在（如TMV亚基因组RNA合成的信号）。

（8）在单链RNA病毒的5′和3′非编码区，一段特定的核苷酸序列可能有多种功能。例如，RNA基因组的5′端非编码序列可能是核糖体识别位点（recognition site），同时，在其负链的3′端区域含有互补序列，为复制酶的识别位点。在马铃薯X病毒属（*Potexvirus*）的成员中，病毒粒体的装配起点（origin of assembly）也位于基因组的5′端（参见第5章第Ⅳ节B部分）。

C. 病毒基因产物的功能

植物病毒基因产物的已知功能可分为下面几种类型：

1. 结构蛋白

小型病毒的外壳蛋白；呼肠病毒科、纤细病毒属病毒以及具有脂蛋白膜的病毒的基质（matrix）、核心（core）蛋白或核蛋白；在这类膜中存在的蛋白质。

2. 酶类

a. 蛋白酶

编码这些蛋白酶的病毒组群的全基因组或基因组的一个片段（segment）首先被翻译成一个多聚蛋白。这些酶的特性已经由 Wellink 和 van Kammen 做过综述（1988）。这些内容将在第 7 章（第Ⅴ节 B. 1 部分）中详细介绍。

b. 参与核酸合成的酶

现在一般认为，所有的植物病毒（卫星病毒除外）都编码至少一种在核酸（基因组核酸或 mRNA 或两者皆有）合成中有酶功能的蛋白质。这些酶的通用术语为聚合酶（polymerase）。在文献中，就不同的聚合酶所用的术语不太一致。本书将使用具有以下含义的各种术语。能催化从 RNA 模板上转录 RNA 的聚合酶称为“依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶”（RNA-dependent RNA polymerase ，RdRp）。拷贝整个 RNA 基因组与亚基因组 mRNA 的酶复合体称为“复制酶”（replicase）。如果 RdRp 以病毒粒体的一个功能性部分（functional part）存在，如弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）和呼肠病毒科（*Reoviridae*），通常我们称之为“转录酶”（transcriptase）。花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）编码的聚合酶，能以全长的病毒 RNA 为模版复制出基因组 DNA，该酶称为“依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶”（RNA-dependent DNA polymerase）或“反转录酶”（reverse transcriptase）。在双生病毒科（*Geminiviridae*）中，病毒基因产物与寄主的依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶（DNA-dependent DNA polymerase）一起发挥作用。

此外还有一个术语上的困难，即复制酶通常具有不同功能的结构域，或是由病毒编码的具有不同功能的亚基组成。例如，RNA→RNA 的复制，除了聚合酶本身的活性，还涉及甲基转移酶（methyltransferase）和解旋酶（helicase）活性。本书将用复制酶这个广义词来描述整体活性（activity *in toto*），并在适当时使用其亚活性（subactivity）的各种具体名称。病毒复制将在第 8 章中加以论述。

3. 病毒的移动与传播

对于多数植物病毒而言，病毒编码的某种特异性蛋白质是病毒在寄主植物细胞间移动和系统性移动所必需的（参见第 9 章第Ⅱ节 D. 2 部分）。其他基因产物已被鉴定为无脊椎动物介体成功传播病毒所必需的蛋白质，而且一些病毒基因产物也可能参与真菌对病毒的传播（参见第 11 章）。

4. 在 RNA 合成中的非酶促作用

存在于一些病毒属的 5′ VPg 蛋白，据认为在 RNA 合成中可作为引物（参见第 8 章第Ⅳ节 J 部分）。

5. AMV 的外壳蛋白

AMV 的外壳蛋白，以及等轴不稳环斑病毒属病毒（ilarviruses）的相应蛋白质在病毒 RNA 的侵染起始中发挥着关键的作用，可能其功能是引发负链的合成。在本书第 8 章（第Ⅳ节 G 部分）将详细讨论该蛋白质。

6. 识别寄主细胞的蛋白质

能被病毒侵染的细菌细胞通常存在于液体培养基中。动物的体细胞之间通常没有细胞质的连接。因此，病毒从受侵染的细菌或动物细胞中释放出来，再感染适当类型的其他细胞。为识别适当的寄主细胞表面的标记，许多侵染细菌和动物病毒的表面都有识别蛋白。大多数植物病毒中没有该识别蛋白，这可能与这类寄主生物的两种特性有关。识别蛋白对植物病毒识别合适的寄主植物的表面没有作用，因为病毒无法独立地穿透植物的表面细胞层（surface layer）。此外，植物病毒一旦侵染一个寄主细胞，如叶片的一个细胞，它就能通过胞间连丝（plasmodesmata）（进行胞间移动）和维管组织（vascular tissue）移动到植株的任何部位。因此，它并不需要专门的识别蛋白去识别寄主内部细胞的表面。然而，在昆虫介体内循环的植物病毒必须越过各种屏障如肠道和唾附腺的细胞壁。这些屏障是通过受体介导的机制而逾越的（参见第 11 章第Ⅲ节 H. 1. a 部分）。

在植物细胞内部，情况可能大不相同。愈来愈多的证据表明，在病毒复制和细胞间移动时有细胞膜的参与。因此，很可能在细胞的内膜系统上存在着病毒蛋白的受体位点。

D. 非编码区

1. 末端结构

病毒核酸的 5′端与 3′端结构已在第 4 章（第Ⅲ节 A. 3. c 部分）中讨论过。除了这些特殊的末端结构外，还有各种各样的末端与基因间的非编码区特征。

2. 5′和 3′非编码区

5′和 3′非编码区（non-coding region）是翻译和复制的调控区。至少在 5′可读框（ORF）的翻译起始过程中，这两个区域相互作用，这将在第 7 章详细叙述。3′非编码区是负链 RNA 合成的起始位点，5′非编码区（负链 RNA 的 3′端）是正链合成的起始位点（参见第 8 章）。

3. 基因间区域

基因间区域的序列与 RNA 的合成及下游 ORF 的翻译有关。亚基因组 RNA 合成的起始也在这些区域，而亚基因组 RNA 在许多病毒中是非 5′ORF 翻译的信使。这些内容会在第 7 章详细讨论。

如第 7 章所述，越来越多的末端和内部序列区域在正链 RNA 基因组信息的表达调控中的相互作用已被识别。类似的相互作用也可能存在于负链与双链 RNA 基因组以及

单链和双链 DNA 病毒的基因组中。

第Ⅲ节　植物病毒的基因组组构

在下面的数节中，将讲述多个植物病毒属已知的基因组组构（genome organization）和基因产物的功能。更多的细节可以参阅本书引用的对许多病毒属的综述与 van Regenmortel 等（2000）。

第Ⅳ节　双链 DNA 病毒

花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）（Rothnie *et al.*，1994；Hohn and Fütterer，1997）

该病毒科成员基因组的基本特征是：它们都是双链环状 DNA 分子，其中一条链有一处不连续区（discontinuity），另一条链有一处或一处以上的不连续区；这些不连续区与病毒的复制有关（参见第 8 章第Ⅶ节 B. 3 部分）。转录是不对称的（asymmetric），所有的编码信息均在一条链上（参见第 7 章第Ⅴ节 H. 1 部分）。

1. 花椰菜花叶病毒属（*Caulimovirus*）（Hohn，1999）

a. 基因组结构

花椰菜花叶病毒属（*Caulimovirus*）的典型成员 CaMV 的 DNA 核苷酸序列由约 8 kb的双链环状 DNA 组成。CaMV 双链环状 DNA 中的一条链有一个不连续区，互补链上有两个，第 8 章将会对此加以详述。所有的花椰菜花叶病毒属病毒在 α（或负）链上只有一个不连续区。该属的其他病毒的正链可能含有一处、两处、三处不连续区。DNA 编码 6 个，也可能是 8 个基因。但除可能存在的基因Ⅷ外，这些基因距离均很近，但有很少部分的重叠。在双链 DNA 上 ORF 的排列如图 6. 1 所示。

b. 病毒编码的蛋白质及其功能

图 6. 1 所示的 8 个 ORF 都已被克隆，以便在体外进行转录与翻译实验。所有 8 个 ORF 都可在体外翻译（Gordon *et al.*，1988），但是，并非所有的蛋白质产物都能在体内检测到，也不是所有的蛋白质都有明确的功能。Gordon 等（1988）用纯化、解体的病毒的抗血清检测了这 8 个 ORF 的翻译产物中，只有 ORF 3、ORF 4 和 ORF 5 的产物能与该抗血清反应，其他均无反应。

i. ORF 1

从 DNA 序列推断，ORF 1 的基因产物大小为 37 kDa。该基因产物已经用载体表达出来并制备了抗血清。该抗血清只能从分离的感染组织中的复制复合体中检测出 46 kDa、42 kDa 和 38 kDa 的蛋白质（Harker *et al.*，1987b）。在相似的研究中，Martinez-Izquierdo 等（1987）发现了一种大小约为 41 kDa 的病毒特异性的蛋白质。M. J. Young 等（1987）发现了一个 45 kDa 的蛋白质。考虑到凝胶上反映的分子质量是不确切的，以上 3 个实验小组发现的主要蛋白质很有可能是预测的 37 kDa 的蛋白质，特别

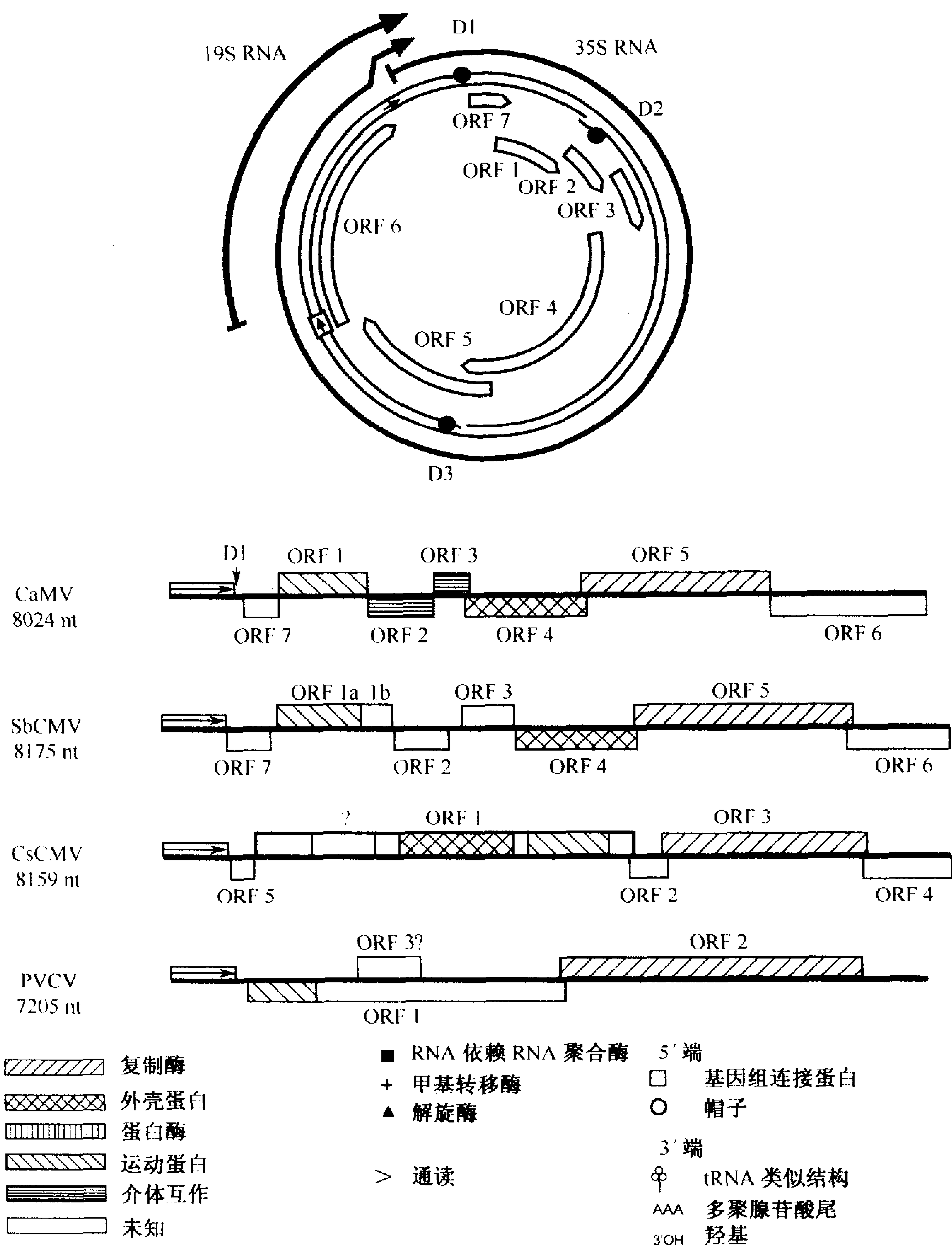


图 6.1　花椰菜花叶病毒属一些病毒的基因组组构。环形图显示了花椰菜花叶病毒（CaMV）的基因组组构。完整的双环代表双链 DNA 基因组（dsDNA）。● 表示三个不连续区（discontinuity）的位置（D1、D2 和 D3）；长方框内箭头所为启动子的位置。双环内部的弧形框表示可读框（ORF），标识为 ORF 1～ORF 7。双环外面两条带箭头的线分别代表 35S RNA 和 19S RNA 转录物，3′端由箭头标识。环形图下方为 CaMV、SbCMV、CsCMV 和 PVCV 基因组的线性示意图。各图在基因间区域起始（框内箭头），每个框表示各个 ORF 的相对位置。垂直箭头表示 D1 位置，框中不同类型的填线表示各 ORF 编码产物的功能。

是体外的翻译产物分子质量大约为 41 kDa（Gordon *et al.*，1988）。

借助免疫学方法，ORF 1 的表达产物能在富集的感染叶片细胞壁组分中发现（Albrecht *et al.*，1988）。在侵染的早期，该蛋白质能在复制复合体中检测到，但稍后即消失了。免疫胶体金细胞化学法表明，ORF 1 蛋白质的聚集位于两个受侵染细胞间的胞

间连丝处或其内部（Linstead *et al.*，1988）。看来细胞壁基质与修饰的胞间连丝有密切联系，表明其可能在细胞间移动中有某种作用。该作用可以从 ORF 1 蛋白质与参与病毒移动的 TMV P30 的之间的序列相似性程度得到支持（Hull *et al.*，1986）。该基因产物在 CaMV 的细胞间移动中的作用将在第 9 章第Ⅱ节 D. 2. d 部分讲述。

ii. ORF 2

在体外实验中，ORF 2 的 mRNA 翻译出一个大约 19 kDa 的蛋白质（Gordon *et al.*，1988）。从病叶组织中分离出的一个 18 kDa 的 ORF 2 产物与病毒质（viroplasm）相伴随。CaMV 的一些自然产生的株系（strain）能由蚜虫传播，然而其他的则不能。若是缺失 ORF 2 内部的一部分，则失去蚜虫传播的能力（Armour *et al.*，1983；Woolston *et al.*，1983）。Campbell 分离物就是不能由蚜虫传播的天然的 CaMV 分离物。该株系产生的 18 kDa 蛋白质（Harker *et al.*，1987a）中由于一个氨基酸的改变（即 94 位的甘氨酸变为精氨酸），其在蚜虫传播中的功能丧失（Woolston *et al.*，1987）。在 CaMV 的各种株系间产生的各种不同重组基因型的实验中，蚜虫可传播性基因定位于 ORF 2 上（Daubert *et al.*，1984）。

综合以上结果可以证明 ORF 2 产物在蚜虫传播中的功能，该基因产物在蚜虫传播中的功能将在第 11 章第Ⅲ节 F. 2 部分详细叙述。看来该 ORF 2 蛋白还有助于使病毒粒体保持在病毒质中（Givord *et al.*，1984）并构成了一种类型的病毒质（Espinoza *et al.*，1991）。该蛋白质在昆虫细胞中可形成准晶体状结构（图 6. 2）（Blanc *et al.*，1993），该结构含有微管蛋白（tubulin）（Blanc *et al.*，1996）。

iii. ORF 3

在体外实验中，ORF 3 mRNA 翻译出一个 14 kDa 的蛋白质，与预期大小相符（Gordon *et al.*，1988）。利用基因Ⅲ编码蛋白质的氨基端 19 个氨基酸寡肽的抗血清，可以在体内检测到一个约 15 kDa 的蛋白质（Xiong *et al.*，1984）。在细菌中表达了由 β-半乳糖苷酶（galactosidase）的氨基末端和全长的 ORF 3 蛋白质（15 kDa）构成的融合蛋白。Mesnard 等（1990）表明基因Ⅲ的产物是一个无序列特异性的（non-sequence-specific）DNA 结合蛋白，该蛋白质的活性位于其 C 端（Mougeot *et al.*，1993）。因此认为该蛋白质是病毒粒体内的结构蛋白。第 11 章第Ⅲ节 F. 2 部分将会讲到，该蛋白质也参与 CaMV 的昆虫传播。

iv. ORF 4

ORF 4 的产物是一个 57 kDa 的前体蛋白质，最终会形成 42 kDa 的蛋白质，即病毒二十面体外壳的蛋白亚基（Franck *et al.*，1980；Daubert *et al.*，1982）。据推测，在形成病毒外壳后 57 kDa 的分子通过蛋白酶解形成 42 kDa 的蛋白质（Hahn and Shepherd，1982）。该蛋白质含有半胱氨酸模体（cys motif）（$CX_2CX_4HX_4C$，其中 C＝半胱氨酸，H＝组氨酸，X＝其他任意氨基酸），据认为该模体形成锌指结构并结合 RNA，这是大多数反转录病毒的外壳蛋白或 gag 蛋白（group-specific antigen）的特征（Covey，1986）。一个紧密结合在病毒上的蛋白激酶将该外壳蛋白中的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化（Ménissier de Murcia *et al.*，1986；Martinez-lzquierdo and Hohn，1987）。外壳蛋白还在有限的程度上被糖基化（Du Plessis and Smith，1981）。

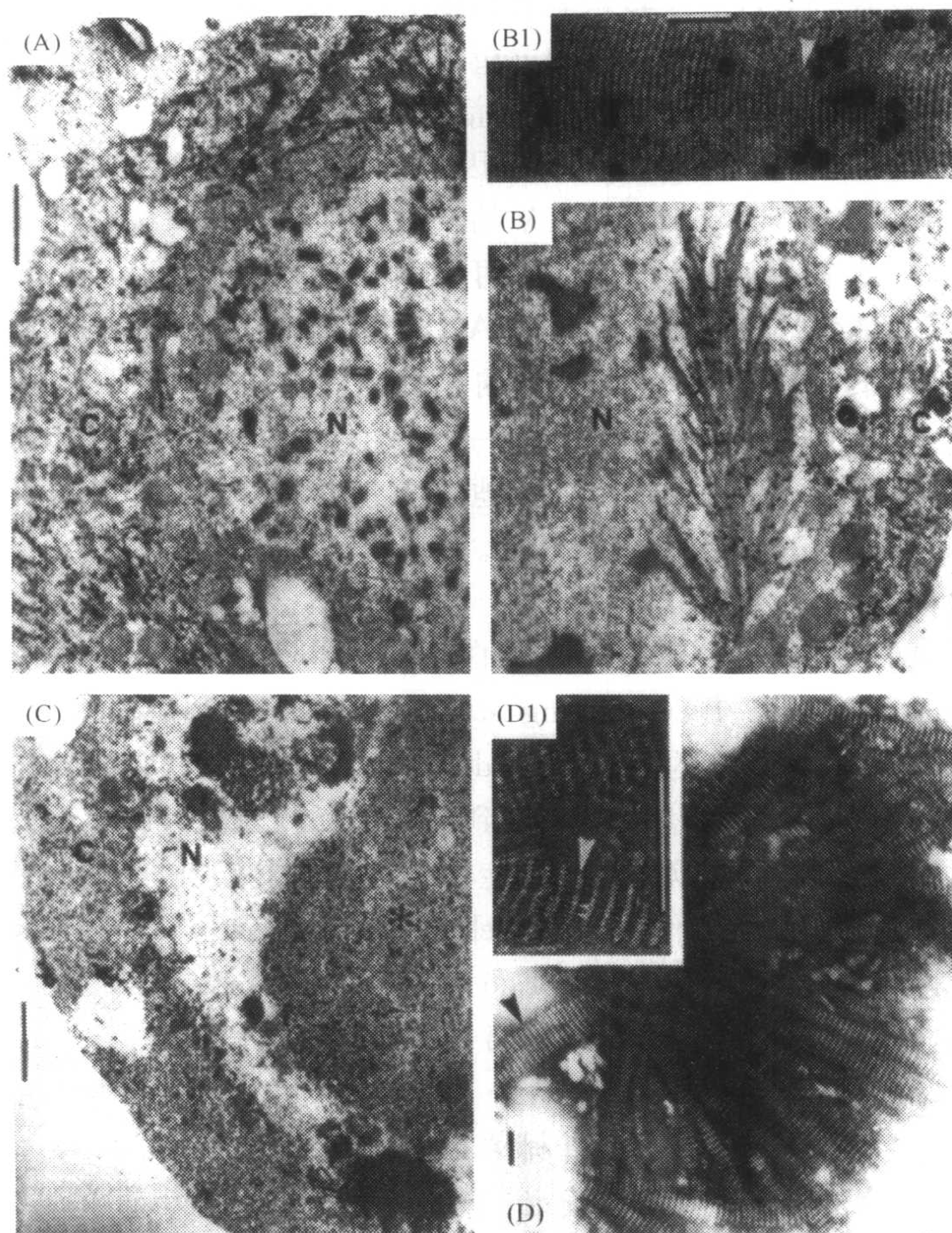


图 6.2 在受杆状病毒（baculoviruses）重组体侵染的昆虫细胞中经过负染的 CaMV P18 蛋白（ORF 2 的产物）准晶体排列的电镜照片。作为比例尺的垂直线段长度代表 1 μm；经允许，引自 Blanc 等（1993）。

v. ORF 5

ORF 5 是 CaMV 基因组中最大的 ORF。从克隆的 DNA 得到的 mRNA 能表达一个预期大小为 79 kDa 的蛋白质（Gordon *et al.*，1988）。该基因也能在大肠杆菌（*E. coli*）中表达。用大肠杆菌中表达的蛋白质制备的抗体，能从病叶提取物中检测到一种约 80 kDa的蛋白质，以及一系列较小的多肽（Pietrzak and Hohn，1987）。以下证据表明，ORF 5 是病毒反转录酶的基因：①与预期大小相符的蛋白质出现在复制复合体（Pfeiffer *et al.*，1984）和病毒粒体中（Ménissier *et al.*，1984；Gordon *et al.*，1988）。此外，与病毒复制复合体连在一起的 80 kDa 多肽能被 ORF 5 翻译产物的特异性抗体识别（Laquel *et al.*，1986）。②CaMV 的基因Ⅴ与反转录病毒的反转录酶基因的一些区域的序列非常相似。③Takatsuji 等（1986）将基因Ⅴ克隆到酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中并加以表达，表达该基因的酵母积累了明显的反转录酶活性。

有人认为，CaMV 的反转录酶基因被翻译成一个大的融合蛋白，包括了邻近的外

壳蛋白基因Ⅳ。该观点来自对反转录病毒的研究结果的类推。反转录病毒中有一个与 *pol*（聚合酶，polymerase）基因相连的 *gag* 基因。*gag* 的多聚蛋白经切割产生 4 个小的病毒的结构蛋白。*pol* 基因编码有 4 种酶活性的复合体：反转录酶活性、RNaseH 活性、内切核酸酶活性和蛋白酶活性。*pol* 基因与 *gag* 基因一起被转录成一个大的融合蛋白（Mason *et al.*，1987）。CaMV 基因Ⅴ的产物中有一个结构域与反转录病毒的蛋白酶有序列相似性，这个事实支持了 CaMV 可表达融合蛋白的观点。利用从克隆的 DNA 转录出的基因Ⅳ和基因Ⅴ的双顺反子 mRNA，不能检测到这样的融合蛋白（Gordon *et al.* 1988），这说明转录酶的翻译起始于它自己的 AUG。然而，Toruella 等（1989）直接证明了 ORF 5 蛋白的 N 端结构域产生一个功能性的天冬氨酸蛋白酶，它能加工 CaMV 的数种多聚蛋白。该基因产物的其他功能，如天冬氨酸蛋白酶活性、反转录酶活性和 RNaseH 活性等将在第 7、8 章阐述。

vi. ORF 6

已经确定 ORF 6 的产物（58 kDa 的蛋白质）是在 CaMV 的病毒质中存在的主要蛋白质（Odell and Howell，1980；Xiong *et al.*，1982）。从克隆的 DNA 转录出的 mRNA，能翻译产生适当大小的多肽（Gordon *et al.*，1988）。从富集的含病毒质的细胞分部组分中，用免疫学的方法可以检测到 ORF 6 的产物（Harker *et al.*，1987b）。各种研究表明，ORF 6 产物在病害诱导、症状表达和寄主范围的控制中起着关键作用，然而其他的基因可能也有一些作用（Schoelz and Shepherd，1988；Baughman *et al.*，1988）。这些问题将会在第 10 章第Ⅲ节 E. 6 和 O. 1. c 部分进一步讨论。ORF 6 产物还能反式激活该病毒其他基因的翻译（参见第 7 章第Ⅴ节 B. 7 部分）。

vii. ORF 7 和 ORF 8

这两个最小的 ORF（7 和 8），在花椰菜花叶病毒属的另一种病毒（CERV）中不存在，所以这两个基因的重要性尚不能确定。然而，它们能在体外翻译出来，并且有间接的证据表明，这两个基因在体内是存在的。基因Ⅶ在蚜虫传播中没有作用。它们含有大量的碱性氨基酸，因此有可能是 DNA 结合蛋白（Givord *et al.*，1988）。对 ORF 8 进行定点诱变，去掉起始密码子或终止密码子，或引入新的终止密码子，对侵染性均没有影响（Schultze *et al.*，1990）。

2. 大豆褪绿斑驳病毒属（*Soymovirus*）（Reddy and Richins，1999）

SbCMV 的基因组全序列为 8175 bp（Hasegawa *et al.*，1989），共包含 9 个 ORF，如图 6. 1 所示。这些 ORF 看来相当于 CaMV 的 ORF，但 ORF 1 分成 ORF 1a 和 ORF 1b。基于 *cys* 序列，ORF 4 被确定为外壳蛋白。ORF 5 含有的模体表明它可能是天冬氨酸蛋白酶和反转录酶。

3. 木薯脉花叶病毒属（*Cavemovirus*）（ de Kocho，1999）

CsVMV 的基因组全序列为 8158 bp（Calvert *et al.* 1995），包括 5 个 ORF，如图 6. 1 所示。ORF 1 产物（186 kDa）的中央有一个区域含有外壳蛋白特有的 *cys* 序列，C 端区域类似于花椰菜花叶病毒属的细胞间移动蛋白。ORF 3 的 77 kDa 蛋白质含有的模体表明它是天冬氨酸蛋白酶、反转录酶和 RNase H。ORF 2、ORF 4 和 ORF 5 产物的功能还不清楚。

4. 碧冬茄明脉病毒属（*Petuvirus*）

PVCV 基因组全序列为 7205 bp，包含 2 个确定的 ORF，可能还有第 3 个 ORF，如图 6.1 所示（Richert-Pöggeler and Shepherd，1997）。ORF 1 的 126 kDa 产物 N 端区域类似于花椰菜花叶病毒的细胞间移动蛋白。C 端区域为 HHCC 和 DD（35）E，是反转录病毒与反转录转座子的整合酶（integrase）的特征性结构。ORF 2 的 125 kDa 产物包含 *cys* 序列，与 CaMV 外壳蛋白的 RNA 结合模体相同，同时还有天冬氨酸蛋白酶、反转录酶和 RNase H 活性。因此，该 ORF 产物类似于反转录病毒的 gag-pol 蛋白质。最近的序列分析表明，只有一个大的 ORF，它包括了 ORF 1 和 ORF 2（K. G. Richert-Pöggeler and T. Hohn，个人通信）。

5. 杆状 DNA 病毒属（*Badnavirus*）（Lockhart and Olszewski，1999）

该属的 5 种病毒的基因组都已测序，并且都有与模式成员 ComYMV 相似的基因组组构，如图 6.3 所示。7.5 kb 的基因组有两处不连续区，每条链上有一处。ORF 1 和 ORF 2 产物的功能尚不确定。ORF 3 编码一个多聚蛋白，可以被切割成 4 个产物：外壳蛋白、天冬氨酸蛋白酶、反转录酶和 RNaseH，以及一个推测有细胞间移动蛋白功能的产物。推测切割作用是由天冬氨酸蛋白酶完成的。外壳蛋白含有大多数反转录元件（reverse transcribing element）都有的 *cys* 模体，还有另一个只在本属以及水稻东格鲁杆状病毒属病毒特有的半胱氨酸模体（$CX_2CX_{11}CX_2CX_4CX_2C$）。

6. 东格鲁病毒属（*Tungrovirus*）（Hull，1996，1999）

该属中唯一的种，水稻东格鲁杆状病毒（RTBV）的基因组包含 4 个 ORF（图

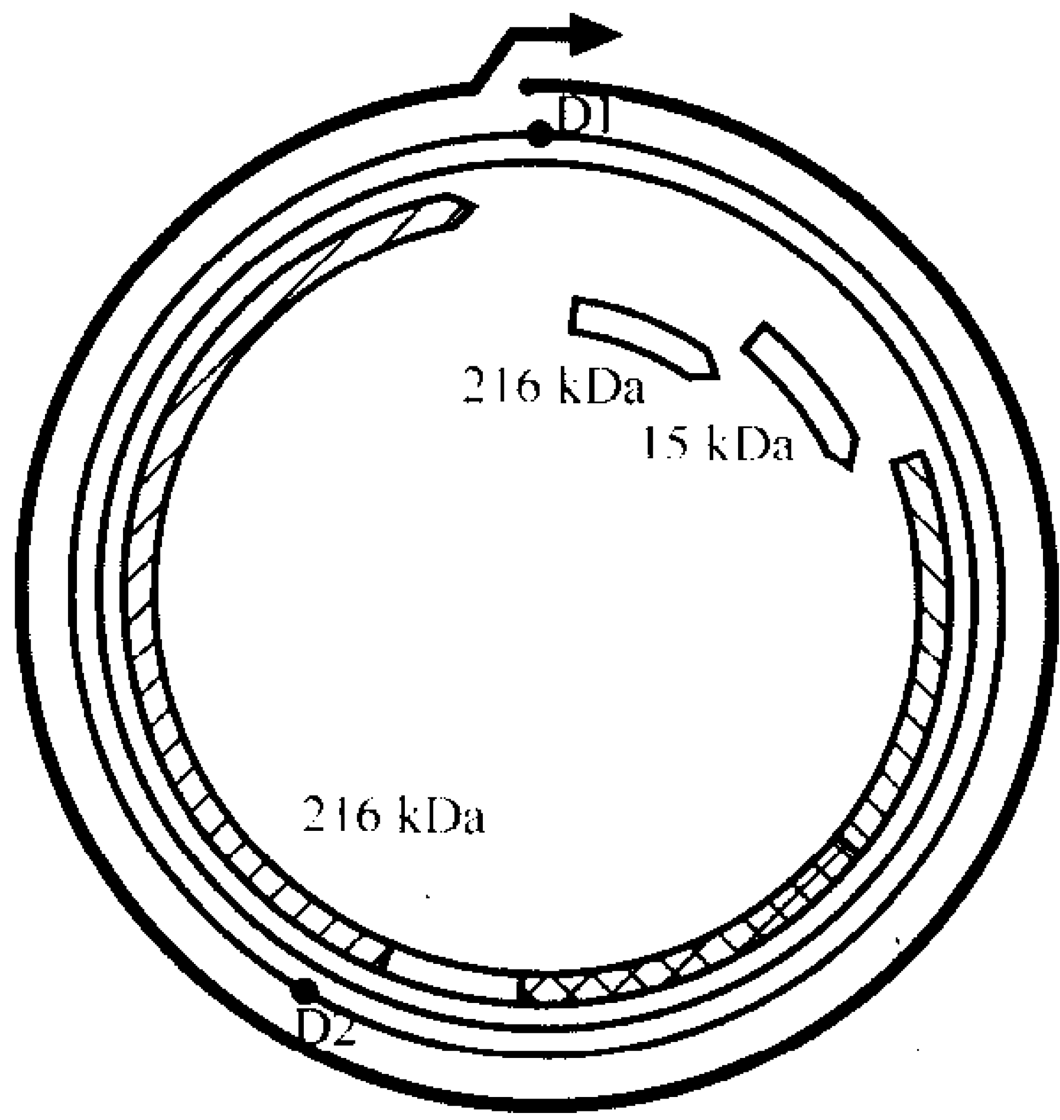


图 6.3　鸭跖草黄斑驳病毒（ComYMV）的基因组结构。完整的双环代表双链 DNA 基因组（dsDNA）；•表示不连续区的位置（D1、D2）；双环内部的弧形框表示可读框（ORF），标识为 ORF 1～ORF 3；双环外周显示了 35S 转录物的位置，3′端由箭头标识；框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

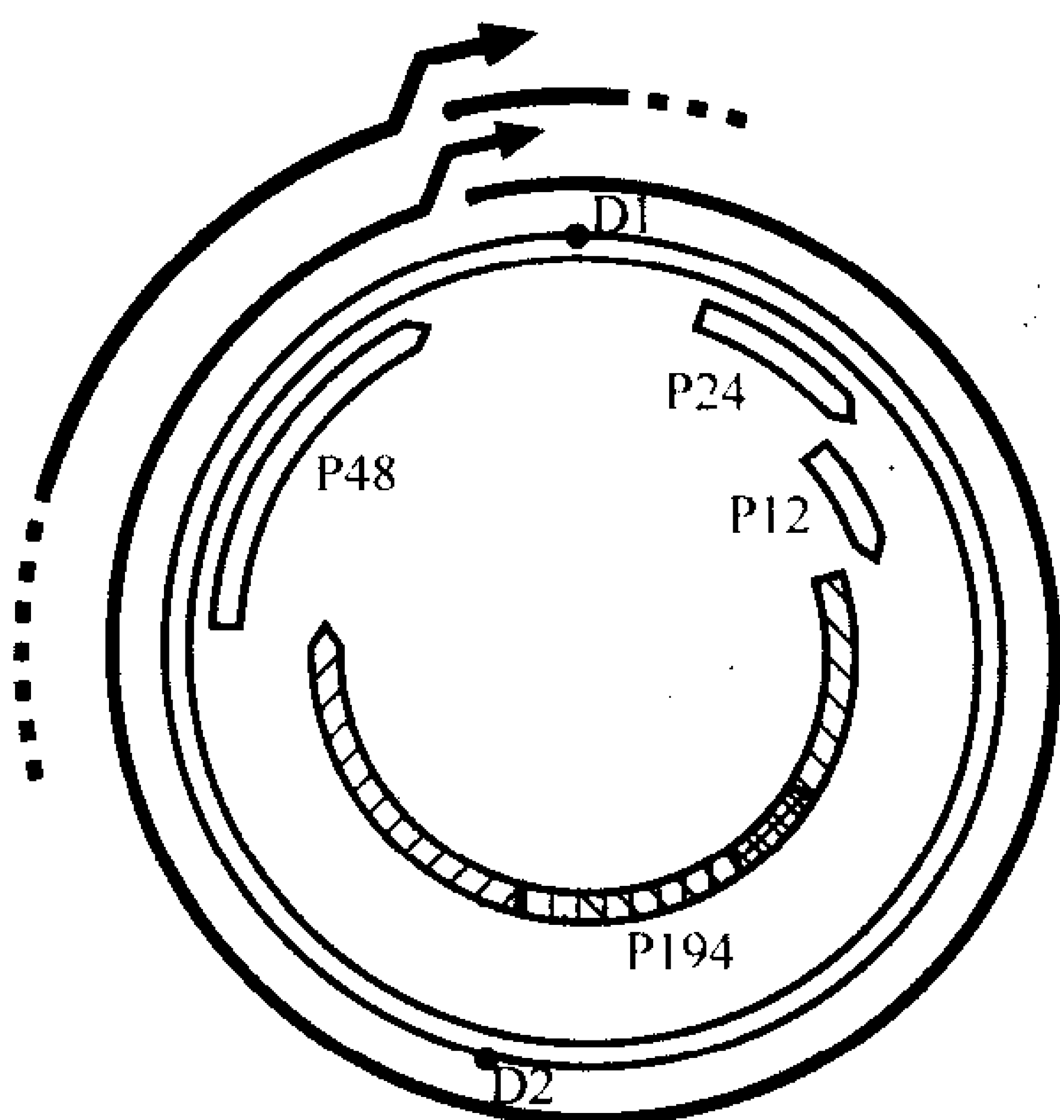


图 6.4　水稻东格鲁杆状病毒（RTBV）的基因组结构。完整的双环代表双链 DNA 基因组（dsDNA）；•表示不连续区的位置（D1、D2）；双环内部的弧形框表示可读框（ORF），标识为 ORF 1～ORF 4；双环外周显示了 35S 转录物的位置以及剪接形成 ORF 4 的 mRNA，3′端由箭头标识；框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

6.4)。ORF 1～ORF 3类似于杆状DNA病毒属(*Badnavirus*)。ORF 4的表达，来自于长于基因组的(more-than-genome length) 35S RNA剪接成的mRNA。产物有一个亮氨酸拉链(leucine zipper)模体，但功能尚未知。

第V节　单链DNA病毒

A. 双生病毒科(*Geminiviridae*)(Buck，1999)

1. 基因组的结构

如第2章第Ⅲ节B部分所述，我们已经描述了该科的4个主要的属，即玉米线条病毒属(*Mastrevirus*)、曲顶病毒属(*Curtovirus*)、菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)与番茄伪曲顶病毒属(*Topocuvirus*)的病毒成员。这4个属的基因组由一个或两个单链DNA组成。这些属的基因组组构与众不同。然而，所有双生病毒(又称联体病毒)(geminiviruses)基因组中均含有共同保守的序列。双组分(two-component)双生病毒中，均有一个大的(约200 bp)非编码的基因间区称为共同区域(common region)，该特征也在单组分(single-component)双生病毒的基因组相近位置存在。该区域的序列能形成发夹环的结构。在这个环中存在保守的序列，TAATATTAC(图8.27)，这是在所有双生病毒中都有的(Lazarowitz，1987)。

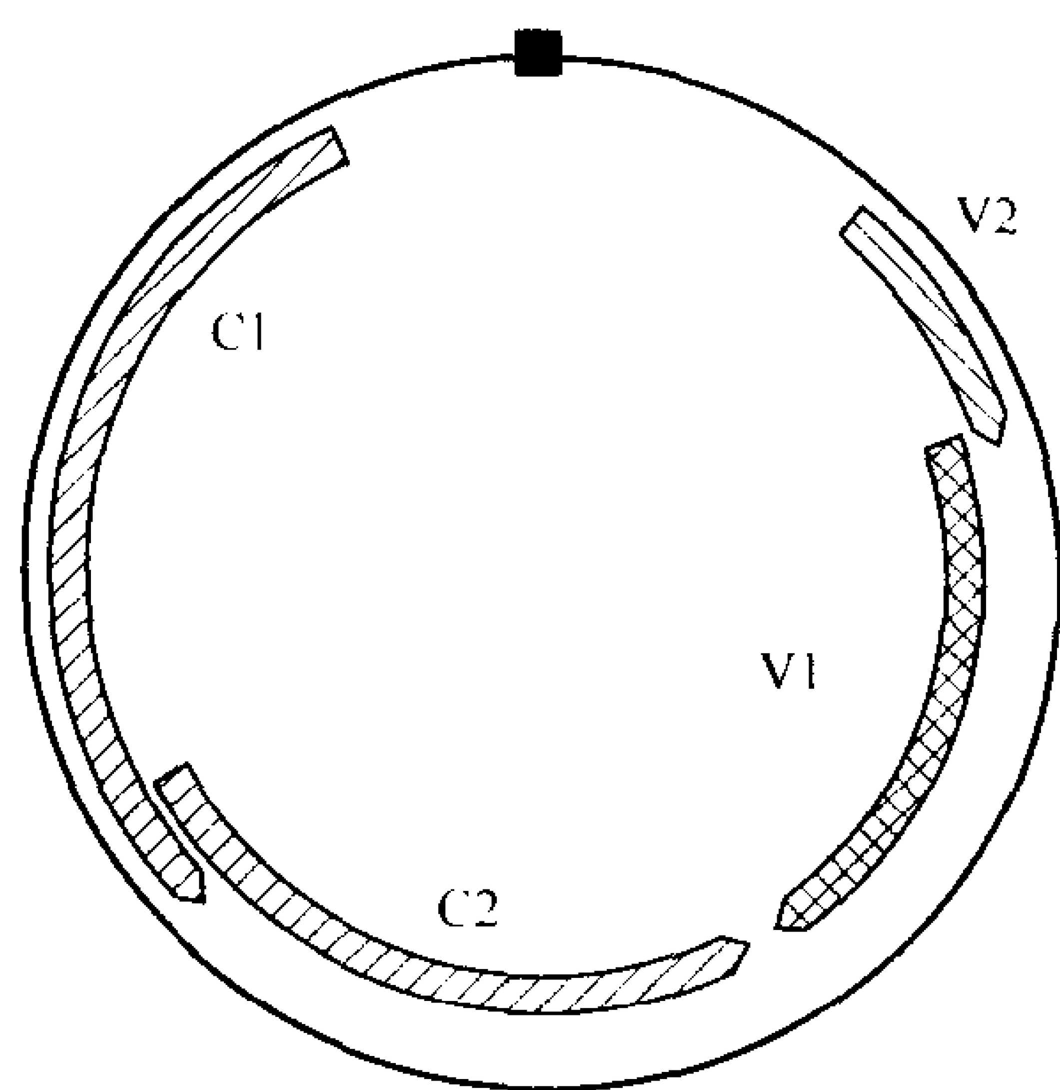


图6.5　玉米线条病毒(MSV)的基因组组构　圆环表示单链DNA基因组。黑框为共同区域(common region)，环内弧形框为ORF。框中填线类型表示各ORF编码产物的功能。具体说明请见图6.1。

2. 玉米线条病毒属(*Mastrevirus*)(Palmer and Rybicki，1998)

MSV(尼日利亚株系)基因组的核苷酸序列表明，2687个核苷酸的单链DNA环，与双组分DNA的双生病毒的基因组没有明显的整体序列相似性(Mullineaux *et al.*，1984)。分析能编码10 kDa以上多肽的ORF，表明有4个潜在的编码区，其排列如图6.5所示。有两个基因间区，长基因隔区(long intergenic region，LIR)和短基因间区(short intergenic region，SIR)。第7章将会讲到，绝大多数的转录，都起始于长基因间区，终止于短基因间区。MSV南非分离物的基因组图谱与尼日利亚分离物有微小差异，此分离物的克隆可以通过土壤杆菌(*A. tumefaciens*)导入系统成功侵染玉米(Lazarowitz，1988)。

从图6.5可以看出，两个ORF在病毒链(简称为V)，还有两个在互补链(简称为C)。ORF V1编码细胞间移动蛋白(参见第9章第Ⅱ节D.2.i部分)，ORF V2编码病毒粒体外壳蛋白，ORF C1和ORF C2编码两个与复制相关的蛋白质；这两个复制相关蛋白质的功能在第8章(第Ⅷ节D.4和D.5)详细讲解。

3. 曲顶病毒属（*Curtovirus*）

BCTV 侵染性克隆的 2993 个核苷酸已经确定（Stanley *et al.*，1986）。该单组分的基因组组构显示，该病毒编码 6 个或 7 个蛋白质（图 6.6）。ORF V1 产物为病毒粒体外壳蛋白，ORF V2 产物调节基因组单链和双链 DNA 的比例，ORF V3 产物促进病毒在细胞间移动。互补链编码的 4 个蛋白质与病毒复制有关。ORF C1 编码 Rep 蛋白质（参见第 8 章第Ⅶ节 D.4 部分），C3 蛋白质类似于菜豆金色花叶病毒属病毒（begomoviruses）的复制增强蛋白（replication enhancer protein），C4 能起始细胞的分裂，C2 蛋白质的功能尚不清楚。

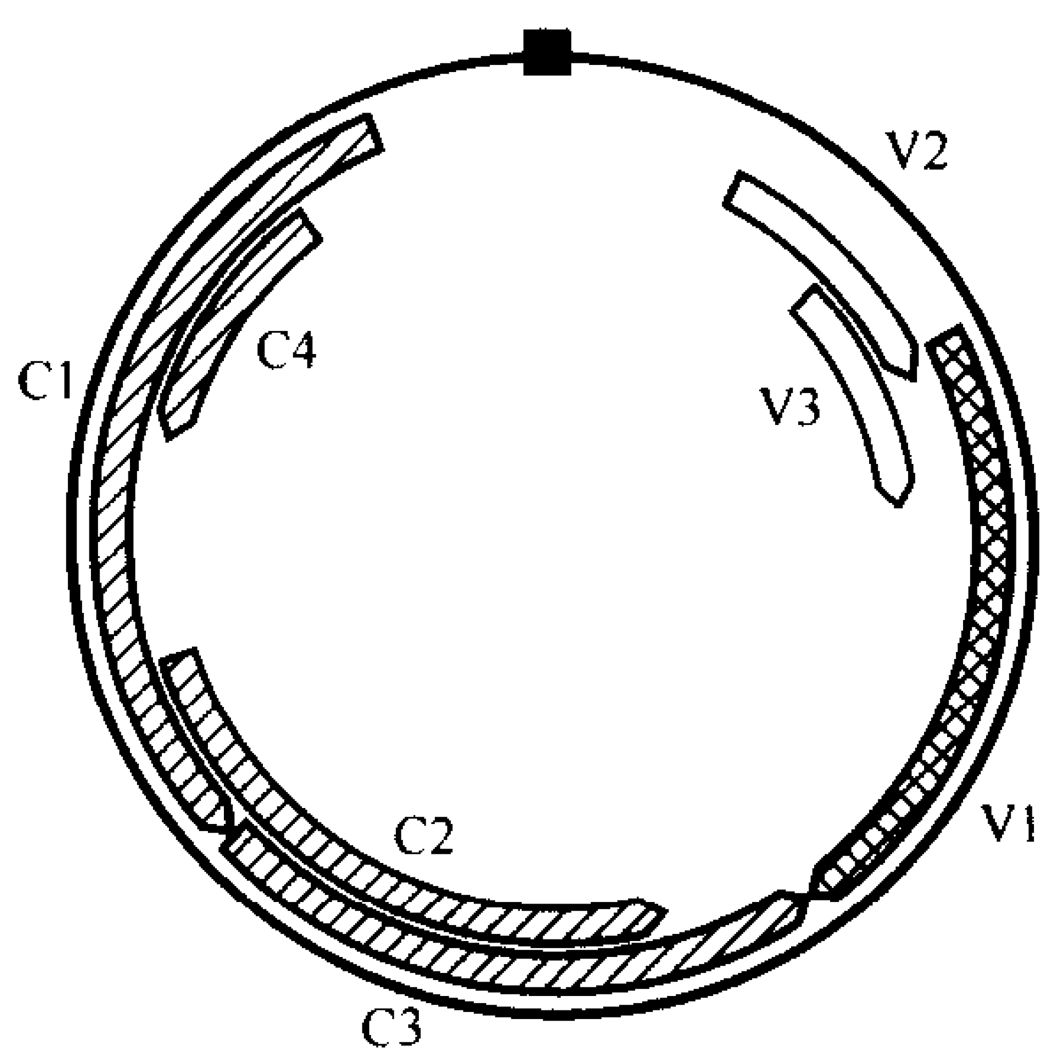


图 6.6 甜菜曲顶病毒（BCTV）的基因组组构。圆环表示单链 DNA 基因组。黑框为共同区域，环内弧形框为 ORF。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

4. 菜豆金色花叶病毒属（*Begomovirus*）

ACMV DNA 的核苷酸全序列表明其基因组由两条大小相似的单链环状 DNA 组成（Stanley and Gay，1983）。Stanley（1983）推测两条 DNA 都是侵染所必需的。在所有已充分鉴定的 DNA 病毒中，这些病毒以及类似的双生病毒是仅有的含有双分体基因组（bipartite genome）的病毒。除了一段大约 200 个核苷酸的几乎相同的非编码区，这两条 DNA 差异很大。这两条 DNA 链分别被人为地称为 A 和 B（一些工作者用术语 1 和 2）。自这些最初的鉴定开始，具有其他特征（如粉虱传播、侵染双子叶植物）亦被归入该属的几种病毒，其基因组只包括单个

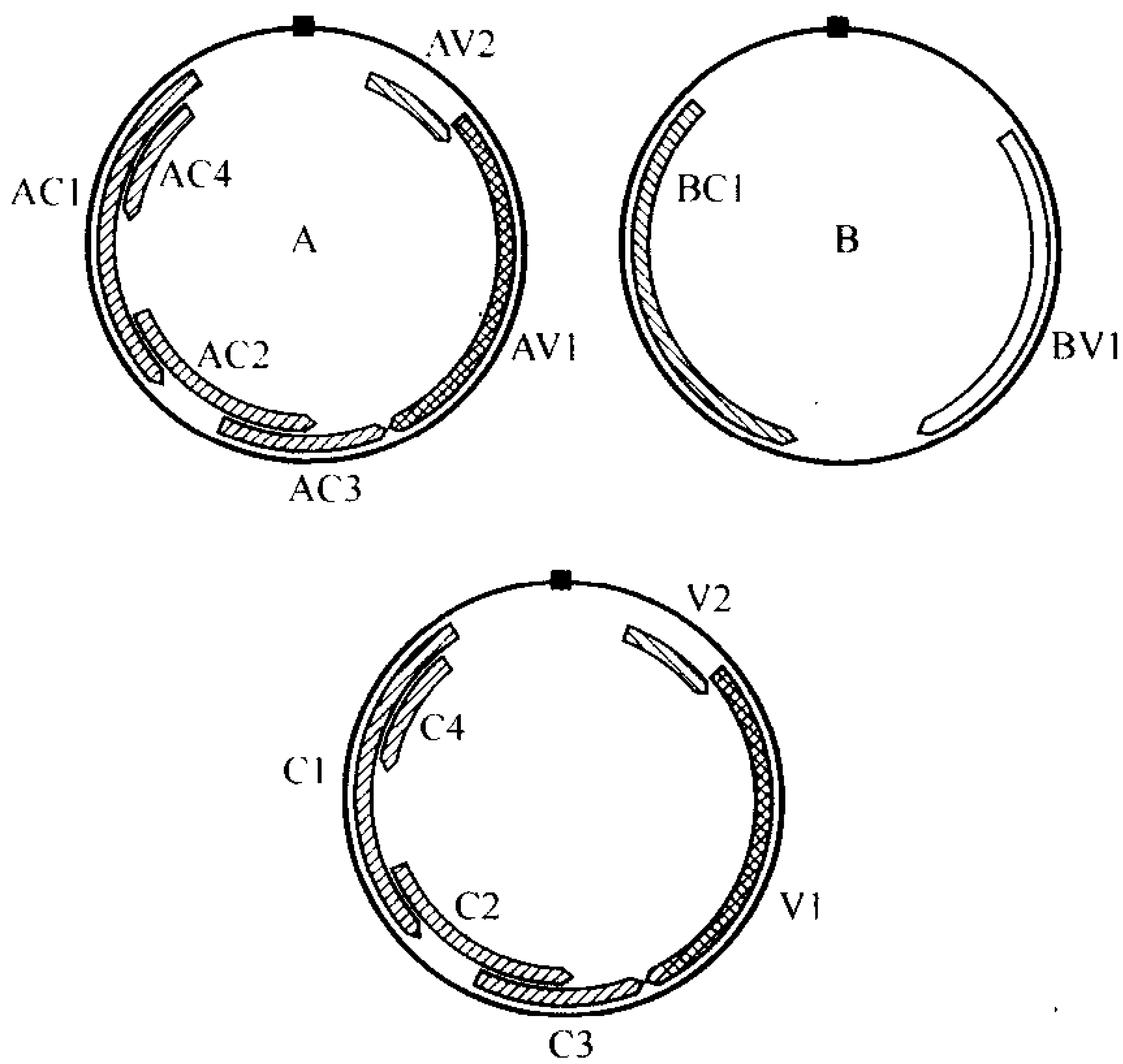


图 6.7 菜豆金色花叶病毒属病毒（begomoviruses）的基因组组构。上部一对图表示双组分病毒（组分 A 和 B），下图表示单组分病毒。圆环表示单链 DNA 基因组。黑框为共同区域，环内弧形框为 ORF。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

DNA 组分。大多数来自“旧大陆”（Old World）和所有来自“新大陆”（New World）的本属病毒均具有两个组分的基因组，单组分的病毒均来自“旧大陆”（欧亚大陆、非洲和大洋洲）。

两个组分的菜豆金色花叶病毒的 DNA A 编码 5 或 6 个基因。病毒粒体义（virion-sense）链（称为 AV）上有一个或两个基因，互补义（complementary-sense）链（AC）上有 4 个基因。DNA B 编码两个蛋白质，一个在病毒粒体义链（BV）上，另一个在互补链（BC）上（图 6.7）。

ORF AV1 产物为外壳蛋白，AV2 产物是细胞间移动蛋白；AV2 在“新大陆”菜豆金色花叶病毒中不存在。DNA A 的互补链编码的蛋白质与复制和表达有关（参见第 8 章第Ⅷ节）。AC1 是 Rep 蛋白，AC2 是转录激活因子蛋白，AC3 是复制增强蛋白，AC4 的功能未知。DNA B 病毒粒体链编码的 BV1 是细胞核穿梭蛋白（参见第 9 章第Ⅱ节 C 部分），BC1（与 AV2 蛋白质一起作用）参与细胞间的移动。

单组分的菜豆金色花叶病毒基因组组构本质上与双组分病毒的 DNA A 是相同的（图 6.7）。

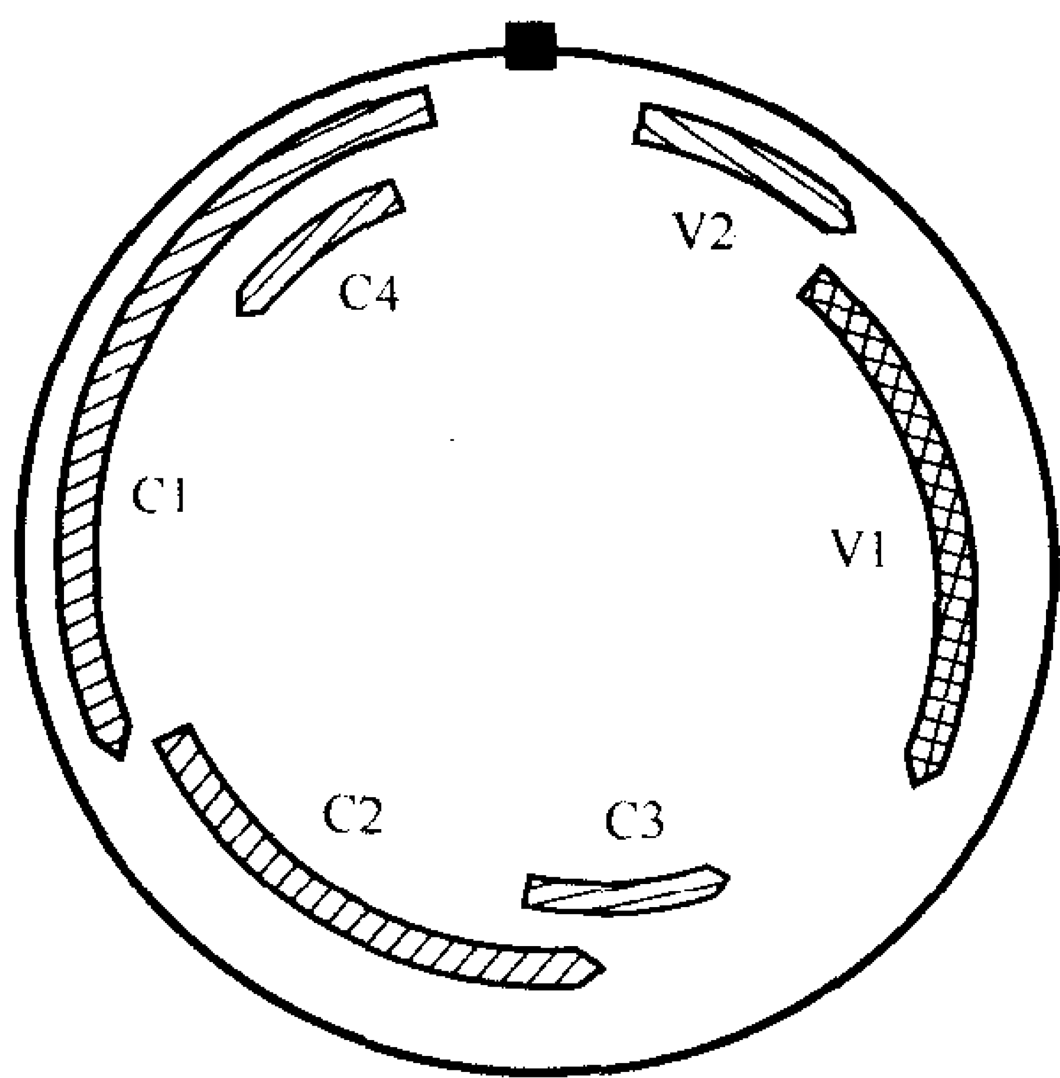


图 6.8 番茄伪曲顶病毒（TPCTV）的基因组组构。圆环表示单链 DNA 基因组。黑框为共同区域，环内弧形框为 ORF。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

5. 番茄伪曲顶病毒属（*Topocuvirus*）

TPCTV 的单组分基因组具有玉米线条病毒属病毒（mastreviruses）和菜豆金色花叶病毒属病毒（begomoviruses）的一些特性（Briddon *et al.*，1996）（图 6.8）。其外壳蛋白更加类似于那些叶蝉传播的玉米线条病毒但与粉虱传播的病毒相似性较低。然而，互补链基因的结构与单组分的菜豆金色花叶病毒相似。

6. 基因产物的功能

a. 外壳蛋白

编码外壳蛋白的基因，定位于与单组分基因组或双组分基因组 DNA A 上相似的位置。

除保护病毒基因组外，外壳蛋白还可能与昆虫介体的特异性有关。该观点得到烟粉虱（*Bemisia tabaci*）传播的病毒外壳蛋白序列同源性的支持。比较来看，分别具有不同的叶蝉介体的 BCTV、MSV 和 WDV 的外壳蛋白 ORF 的同源性低得多（MacDowell *et al.*，1985；Stanley *et al.*，1986）。

Briddon 等（1990）构建了一些嵌合体（chimeric）克隆，其中 ACMV DNA 1 的外壳蛋白基因被替换为 BCTV（由叶蝉传播）的相应基因。该 BCTV 基因在植物中表达，产生了包含 ACTV DNA 的病毒粒体。这些粒体被 BCTV 的叶蝉介体传播，而正常的 ACMV 在被注射进昆虫体内后不能由其传播。这些结果表明，传播介体的特异性是外壳蛋白的一种功能。在第 11 章（第Ⅳ节 D.1 部分）将对此进行进一步的讨论。

TGMV（由粉虱传播）的遗传分析表明，外壳蛋白不是侵染性、系统侵染和症状发展

所必需的（Gardiner *et al.*，1988）。与双组分的 TGMV 不同，单分体病毒（monopartite virus）的外壳蛋白与侵染性有关，如 MSV（Boulton *et al.* 1989，Lazarowitz *et al.* 1989）、WDV（Woolston *et al.*，1989）和 BCTV（Briddon *et al.* 1989）。

b. DNA 复制相关的基因

直接与复制相关的基因存在于单组分 DNA 的补充链和双组分病毒的 DNA A。这些基因产物将在第 8 章（第Ⅷ节 D. 4 和 D. 5）详细叙述。需要提醒的是，复制功能是与其他功能密切协调的，其他很多病毒基因组区域相关的编码区和非编码区，都有可能参与新的病毒 DNA 分子的合成。

c. 病毒移动

双生病毒编码一些参与基因组在细胞内移动和细胞间移动的蛋白质。在细胞内，病毒基因组必须进入细胞核；介导该过程的病毒编码的产物将在第 9 章（第Ⅱ节 C 部分）讲述。同样地，细胞间移动也受到病毒编码的蛋白质的促进（参见第 9 章第Ⅱ节 D. 2. i 部分）。

d. 昆虫传播

由于 DNA B 只在粉虱传播的菜豆金色花叶病毒中存在，这表明，DNA B 产物与昆虫传播有关。插入与缺失突变实验结果表明，ACMV DNA 2 的两个编码区除了可能都

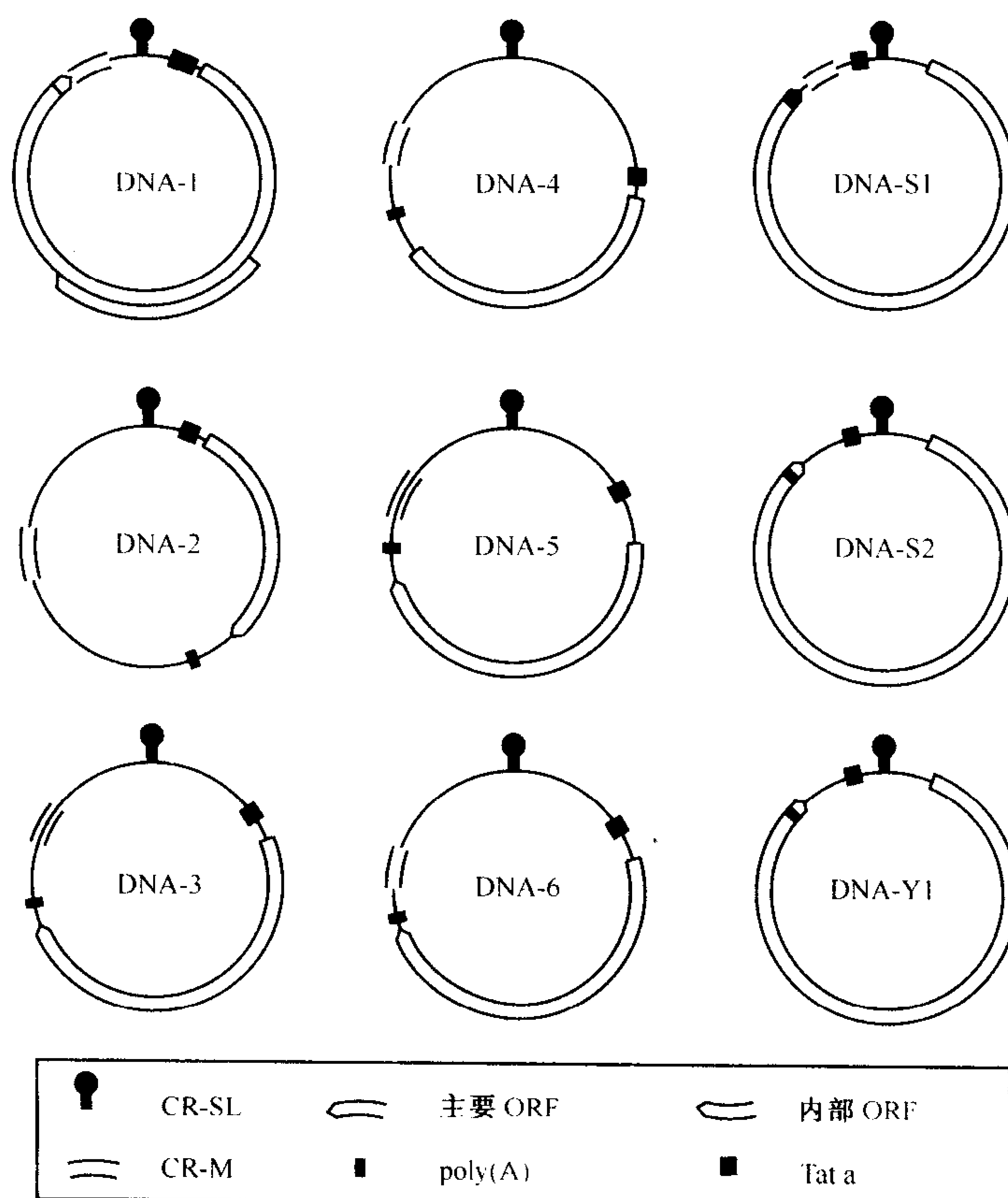


图 6.9　香蕉束顶病毒（BBTV）的基因组组构。该病毒经鉴定含有 9 个环状单链 DNA 组分。第 1～6 条 DNA 在所有种中均存在，而组分 S1、S2 和 Y1 也存在于台湾分离物中。承蒙惠允，引自 Randles 等（2000）。

在昆虫传播中发挥作用外，还有其他的功能（Etessami *et al.*，1988）。第 11 章（第Ⅳ节 D.1 部分）将会讲到这个实验，它表明外壳蛋白（DNA A 的一个基因产物）可控制昆虫介体的传播。

B. 矮缩病毒科（*Nanoviridae*）

该科的病毒基因组由若干大小为 1 kb 左右的单链环状 DNA 组成。DNA 的数目因病毒而异。例如，BBTV* 的澳大利亚分离物有 6 个 DNA 组分（图 6.9），而 FBNYV 有 11 个 DNA 组分（表 6.1）。

表 6.1 矮缩病毒科病毒（nanoviruses）**各组分的功能**

	BBTV	FBNYV	MDV	SCSV
DNA 组分的数目	6 (8)[a]	11	10	7
功能				
Rep[b]	C1[f]	C2	C10	C2、C6
Rep-相关[c]		C1、C7、C9、C11	C1、C2、C3	
与 Rb 互作[d]	C5	C10	C4	
外壳蛋白	C3	C5	C9	C5
推定的移动蛋白	C4	? C4	C8	
细胞核穿梭蛋白	C6			
未知	C2	C3、C6、C8	C5、C6、C7	C1、C3、C4、C7
其他功能[e]		蚜虫传播		

注：a. 据报道，一些分离物含 8 条组分；b. 据认为可起始复制的蛋白质；c. 类似 Rep 的蛋白质；d. 与类似成视网膜细胞瘤的（retinoblastoma，Rb）植物蛋白互作可能调控细胞周期的蛋白质；e. 目前没有对应的相关基因产物的其他功能；f. 已发表的组分数。

数据来源：BBTV：Burns 等（1995），Wanitchakorn 等（2000）。FBNYV：Katul 等（1997，1998），Franz 等（1999），Timchenko 等（1999）。MDV：Sano 等（1998）。SCSV：Boevink 等（1995）。引用的数据均得到版权所有者的惠允。

所有 DNA 组分结构上都类似于正链，以一个方向转录，非编码区含有一个保守的茎-环结构和其他结构域（图 6.9）。

单独的 DNA 组分编码的产物有与复制有关的，也有与复制无关的。复制蛋白（Rep）以及与复制相关的其他蛋白质［如与类成视网膜细胞瘤的植物蛋白质（retinoblastoma-like plant protein）互作的蛋白质］将在第 8 章（第Ⅷ节 E 部分）详细讲述。该科病毒的蛋白质的已知功能见表 6.1。从该表可以看出，需要有一个更好的方法来命名这些 DNA 组分，使之与基因产物的功能一致。

包含一个完整的本科病毒功能基因组的独特的 DNA 组分的数目尚未确定。可能有一些“卫星”分子，特别是考虑到 BBTV 的澳大利亚分离物有 6 个 DNA 组分而中国台湾地区分离物有 8 个组分。

* 现已成为新成立的香蕉束顶病毒属（*Babuvirus*）的成员——译者。

第Ⅵ节　双链 RNA 病毒

双链 RNA 病毒的基因组由多个线性的双链 RNA 组成。在大多数情况下，双链 RNA 片段是单顺反子的。也有一些片段是明显包含了两个 ORF 的，但是还不能确定是否两个 ORF 都能表达。不同属的病毒构成基因组的 RNA 分子数是不同的。

A. 呼肠病毒科（*Reoviridae*）

植物呼肠病毒（plant reovirus）的基因组由 10 或 12 条 RNA 片段组成。这些片段依照它们电泳时在凝胶中的迁移率来编号，迁移最慢的一条就是片段 1。然而，对这些片段的测序结果表明，真正的大小并不一定与电泳迁移率推断的一样。以下有多个例子表明，编号较大的 RNA 片段有时比编号较小的还要大。

已鉴定出 4 类基因产物，分别是外壳蛋白（结构蛋白）、RNA 复制相关蛋白、非结构蛋白以及功能未知的蛋白质。有时根据与已充分鉴定的侵染脊椎动物的呼肠病毒序列相似性或共有的模体而推断相应蛋白质的功能。

1. 斐济病毒属（*Fijivirus*）（Marzachi *et al.*，1995）

斐济病毒属病毒的基因组分为 10 条 RNA 片段，表 6.2 总结了已知的编码信息。表 6.2 还列出了侵染昆虫的褐稻虱呼肠病毒（*Nilaparvata lugens reovirus*，NLRV）（被归类为一种斐济病毒属病毒）编码产物的功能（Nakashima *et al.*，1996）。该病毒其他的 RNA 片段的功能已经确定，这可以提示，也能侵染植物的斐济病毒可编码哪些功能基因产物。应当记住，这些病毒除了可在植物寄主中复制外，亦可在其昆虫介体中复制。

表 6.2　斐济病毒属（*Fijivirus*）成员的基因组特性

节段号码	RBSVD			MRDV			OSDV			NLRV		
	大小/bp	蛋白质大小/kDa	蛋白质功能	大小/bp	蛋白质大小/kDa	蛋白质功能	大小/bp	蛋白质大小/kDa	蛋白质功能	大小/bp	蛋白质大小/kDa	蛋白质功能
1	ND[a]			ND			ND			4391	165.9	Core/Pol
2	ND			ND			ND			3732	136.6	OsB
3	ND			ND			ND			3753	138.5	Mc
4	ND			ND			ND			3560	130	U
5	ND			ND			ND			3427	106.4	U
6	ND			2193	41.0 36.3	Ns TuP U	ND			2970	95.1	U
7	2193	41.2 36.4	Ns/TuP Ns	1936	68.1	?Core NTP	1944	42.0 30.0	?Ns TuP U	1994	73.5	Core/NTP
8	1927	68.1	Core ?NTP	1900	40 24.2	?Ns/VP U	1871	66.2	? Mos	1802	62.4	Mos

续表

节段号码	RBSVD			MRDV			OSDV			NLRV		
	大小/bp	蛋白质大小/kDa	蛋白质功能	大小/bp	蛋白质大小/kDa	蛋白质功能	大小/bp	蛋白质大小/kDa	蛋白质功能	大小/bp	蛋白质大小/kDa	蛋白质功能
9	1900	39.9 24.2	Ns VP Ns	ND	-	—	1893	68.2	?Core/NTP	1640	33.0 23.6	Ns/VP Ns
10	1801	63.3	Mos	1802	62.9	? Mos	1761	35.7 22.7	?Ns/VP U	1430	49.4	Ns/?TuP

注：a 缩写：Core=病毒核心蛋白；Mos=主要外层衣壳蛋白（major outer shell protein）；Mc=主要核心蛋白（major core protein）；ND = 尚未确定（not determined）；Ns = 非结构蛋白；NTP = NTP-结合蛋白；OsB = 外层衣壳，B刺突；Pol = RNA 聚合酶；TuP = 形成管状结构的蛋白；U = 功能未知；VP = 病毒质中存在的蛋白质（protein found in viroplasm）；? = 根据与其他病毒的相似性推测的可能功能。

经允许，数据引自 van Regenmortel 等（2000）。

如第5章（第Ⅶ节2）所述，斐济病毒粒体有两层外壳，外壳（outer shell）的12个顶点（vertice）上有A型刺突（spike），内壳（inner shell）或核心部分有B型刺突。NLRV片段3的基因产物是主要的核心蛋白；片段1与片段7的产物也在内核，具有酶活性；片段2的产物构成内核的B型刺突；片段8、9、10基因产物为非结构蛋白；片段4、5、6产物的功能尚不清楚。

2. 水稻病毒属（*Oryzavirus*）

水稻病毒属病毒有10条RNA片段。该属中的模式种为RRSV，其基因组的结构已基本研究清楚，总结如表6.3。与本科中其他两个属不同的是，其RNA聚合酶是由第二大的片段而不是最大的片段编码的。然而，与其他两个属一样，这是最大的基因产物。

表6.3 水稻齿叶矮缩病毒（RRSV）的基因组特性

节段编号	大小/bp	蛋白质大小/kDa	功能[a]
1	3849	137	OsB
2	3810	118	Core
3	3669	130	Mc
4	3823	145	Pol
		36.9	U
5	2682	90	Gt
6	2157	65.6	U
7	1938	66	Ns
8	1814	67	Pre
		25.6	Pro
		41.7	Mos

续表

节段编号	大小/bp	蛋白质大小/kDa	功能[a]
9	1132	38.6	Sp
10	1162	32.3	Ns

注：a缩写：Core＝核心蛋白；Gt＝鸟苷酸转移酶（guanylyltransferase）活性；Mc＝主要核心蛋白；Mos＝主要外层衣壳蛋白；Ns＝非结构蛋白；OsB＝外层衣壳B型刺突（outer shell B spike）；Pol＝RNA聚合酶；Pre＝前体蛋白；Pro＝蛋白酶；Sp＝参与介体传播的刺突（spike involved in vector transmission）；U＝未知。

经允许，数据引自van Regenmortel等（2000）。

如其他大多数植物呼肠病毒一样，水稻病毒属的病毒粒体为双层外壳，外层衣壳有A型刺突，内壳有B型刺突。B型刺突由片段1编码，片段9编码的A型刺突与飞虱（delphacid planthopper）介体的传播有关。

3. 植物呼肠病毒属（*Phytoreovirus*）（Omura，1995；Hillman and Nuss，1999）

植物呼肠病毒属病毒有12条基因组片段。RDV的基因组已被详细研究，表6.4总结了RNA片段的特性。其中10条片段含有一个ORF，一条含有两个ORF，一条含有三个ORF。然而，尚不能确定体内这些附加的ORF是否表达。

表6.4 水稻矮缩病毒Akita分离株的基因组特性

节段编号	大小/bp	蛋白质大小/kDa	功能[a]
1	4423	164.1	Core/Pol
2	3512	123.0	Os
3	3195	114.2	Mc
4	2468	79.8	Ns
5	2570	90.5	Core/Gt
6	1699	57.4	Ns
7	1696	55.3	Core/Nab
8	1427	46.5	Mos
9	1305	38.9	Ns
10	1321	39.2	Ns
11	1067	20.0	Ns
		20.7	U
12	1066	33.9	Ns
		10.6	Pp
		9.6	U

注：a缩写：Core＝核心蛋白；Gt＝具鸟苷酸转移酶活性的蛋白质；Mc＝主要核心蛋白；Mos＝主要外层衣壳蛋白；Nab＝核酸结合蛋白；Ns＝非结构蛋白；Os＝外层衣壳蛋白；Pol＝RNA聚合酶；Pp＝磷蛋白（phosphoprotein）；U＝未知。

经允许，数据引自van Regenmortel等（2000）。

从表 6.4 可以看出，片段 2、3 和 8 编码结构蛋白；片段 2 编码的外层衣壳蛋白是介体传播所必需的；片段 1、5 和 7，很有可能还有片段 12 的产物之一与 RNA 复制有关；片段 4、6、9、10、11 和片段 12 的一个产物被归为非结构蛋白。

4. 讨论

如前所述，植物呼肠病毒的 RNA 片段由其在凝胶中的电泳迁移率来鉴别。随着这些 RNA 的序列和功能信息的利用，对基因组组分的分类开始变得混乱起来。例如，从表 6.2 可以看出，不同病毒的编号（或大小）相近的 RNA 片段并不一定有同样的功能。这样，有 NTP 结合活性的内核蛋白，在 RBSDV 中由片段 8（1927 bp）编码，MRDV 中由片段 87（1936 bp）编码，OSDV 中由片段 9（1893 bp）编码，NLRV 中由片段 7（1994 bp）编码；然而，OSDV 的片段 9 比片段 8 大。对基因组组构和植物呼肠病毒功能的理解将会明显增加，这样就需要形成一个混乱较少、含有更多信息的命名基因组片段的系统。

B. 双分病毒科（*Partitiviridae*）

该科中的两个植物病毒属［α 隐潜病毒属（*Alphacryptovirus*）和 β 隐潜病毒属（*Betacryptovirus*）］的基因组，分别由两条双链基因组 RNA 片段构成（Milne and Marzachi，1999）。α 隐潜病毒属病毒（alphacryptoviruses）的大片段编码与病毒粒体相伴随的 RNA 聚合酶，小片段编码外壳蛋白。推测 β 隐潜病毒属病毒（betacryptoviruses）也有同样的基因组排列。

C. 巨脉病毒属（*Varicosavirus*）

LBVV 的双分体基因组由大小分别为 6.8 kb 和 6.1 kb 的单链 RNA 组成*。去掉病毒粒体的蛋白质组合后可检测到单链和双链 RNA。目前对其基因组组构一无所知。

第Ⅶ节　负义单链 RNA 基因组

具有负单链 RNA 基因组的植物病毒包括两个科［弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）与布尼亚病毒科（*Bunyaviridae*）］和两个尚未归科的属［纤细病毒属（*Tenuivirus*）与蛇状病毒属（*Ophiovirus*）］。每个病毒基因组 RNA 都与一个称为核衣壳（nucleocapsid）的蛋白质相连。在这两个科的病毒中，核衣壳被包装于有被膜的粒子（membrane-bound particle）中。这些结构包括数种病毒编码的蛋白质，已在第 5 章第Ⅷ节叙述。纤细病毒属病毒（tenuiviruses）和蛇状病毒属病毒（ophioviruses）的基因组似乎并不是包含在有膜的粒子中，然而，以纤细病毒属病毒与布尼亚病毒属病毒的关系而言，也有可能存在于有膜的粒子中。所有负单链 RNA 病毒粒体中都有病毒编码的 RNA 聚合酶，这是作为在侵染循环中一个早期步骤——初始的转录所必需的（参见第 7 章第Ⅳ节 A 部分）。

* 原来曾认为该病毒具有双链 RNA 基因组——译者。

A. 弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）（Jackson *et al.*，1999）

如第 2 章（第Ⅲ节 E 部分）所述，侵染植物的弹状病毒（plant rhabodviruses）包括两个属：细胞质弹状病毒属（*Cytorhabdovirus*）和细胞核弹状病毒属（*Nucleorhabdovirus*）。其很多特性都与侵染动物的弹状病毒类似，数种动物弹状病毒的基因组组构已经得到阐明。因此，像感染脊椎动物的弹状病毒一样，侵染植物的弹状病毒拥有由一个负单链 RNA 构成的基因组，大小为 11 000～13 000 nt。

细胞质弹状病毒属 LNYV 的基因组（Wetzel *et al.*，1994）以及细胞核弹状病毒属 SYNV 的基因组（Heaton *et al.*，1989a）已完成测序，而且二者具有类似的结构。SNYV 的基因组组构如图 6.10 所示。3′端（这是一个负链基因组）有一个 144 nt 的前导序列（leader sequence），后面跟着 6 个基因，基因之间有较短的基因间区域（intergenic region）。如第 7 章（第Ⅳ节 A 部分与第Ⅴ节 F 部分）所述，其中每个基因都是单独转录的。

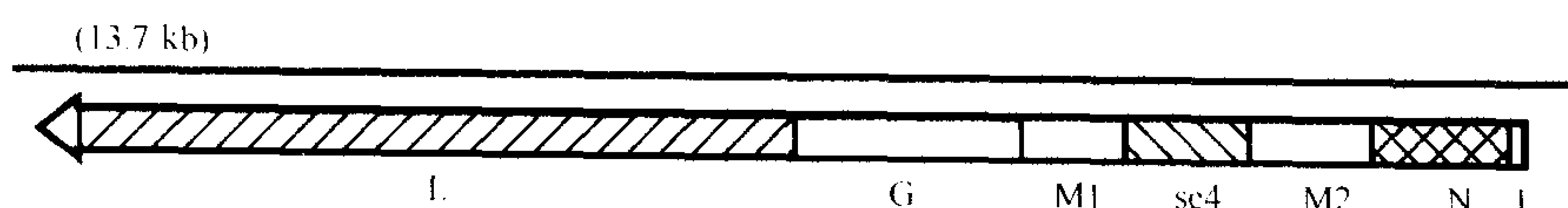


图 6.10　细胞核弹状病毒属的典型种苦苣菜黄脉病毒（SYNV）的基因组组构。单线表示负单链 RNA 基因组，已鉴定的最终基因产物的编码区由框标识。箭头表示 C 端。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

其中有 4 个蛋白质是结构蛋白（参见第 5 章第Ⅷ节）。N 基因编码 54 kDa 的核衣壳蛋白，M1 和 M2 是基质蛋白（matrix protein）（其中 M2 是磷酸化的）；G 基因编码的糖基化的刺突（70 kDa）穿过病毒膜（viral membrane）伸展至病毒粒体表面；L 基因编码的 RNA 聚合酶（241 kDa）组装于病毒粒体内。这 5 个蛋白质在感染动物的弹状病毒中也有，但是第 6 个蛋白质，sc4，是植物弹状病毒所特有的。该 37 kDa 的蛋白质是膜伴随（membrane-associated）蛋白质，含有较多的丝氨酸和苏氨酸残基（16%），还有 4 个潜在的酪蛋白激酶Ⅱ（casein kinase Ⅱ）的磷酸化位点，还包含与 α-淀粉酶（amylase）和天冬氨酸蛋白酶相关的模体（Scholthof *et al.*，1994）。推测该蛋白质可能调控病毒的复制，或者促进病毒通过胞间连丝在细胞间移动。

B. 布尼亚病毒科（*Bunyaviridae*）

1. 番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）（Moyer，1999）

番茄斑萎病毒属病毒（tospoviruses）的粒体内包裹了 3 条 RNA 片段，其中最大的（L RNA）是负义，其余两个（M RNA 和 S RNA）分别编码两个蛋白质（参见第 7 章第Ⅴ节 B.12 部分），如图 6.11 所示。因此，该病毒基因组共编码 5 个蛋白质。L RNA 编码的蛋白质为 RNA 聚合酶（330 kDa）。M RNA 的病毒粒体义（virion-sense）链编码一个 34 kDa 的蛋白质（称为 NS_M），与病毒的细胞间移动有关（参见第 9 章第Ⅱ节 D.2.j 部分）。M RNA 的互补义（complementary sense）链编码一个 127 kDa 的蛋白

质，它被进一步加工成两条多肽，每条都经过糖基化。估计 C 端的 G1 蛋白的大小为 75 kDa，N 端的 G2 蛋白为 46 kDa；由于糖基化，它们在凝胶中的迁移率分别相当于 78 kDa和 58 kDa（Kormelink *et al.*，1992）。这两个糖蛋白构成病毒粒体表面的刺突。S RNA 病毒粒体链编码的蛋白质（NS_S，52 kDa）的功能未知。这条 RNA 互补链的 ORF 编码一个29 kDa的核衣壳蛋白。

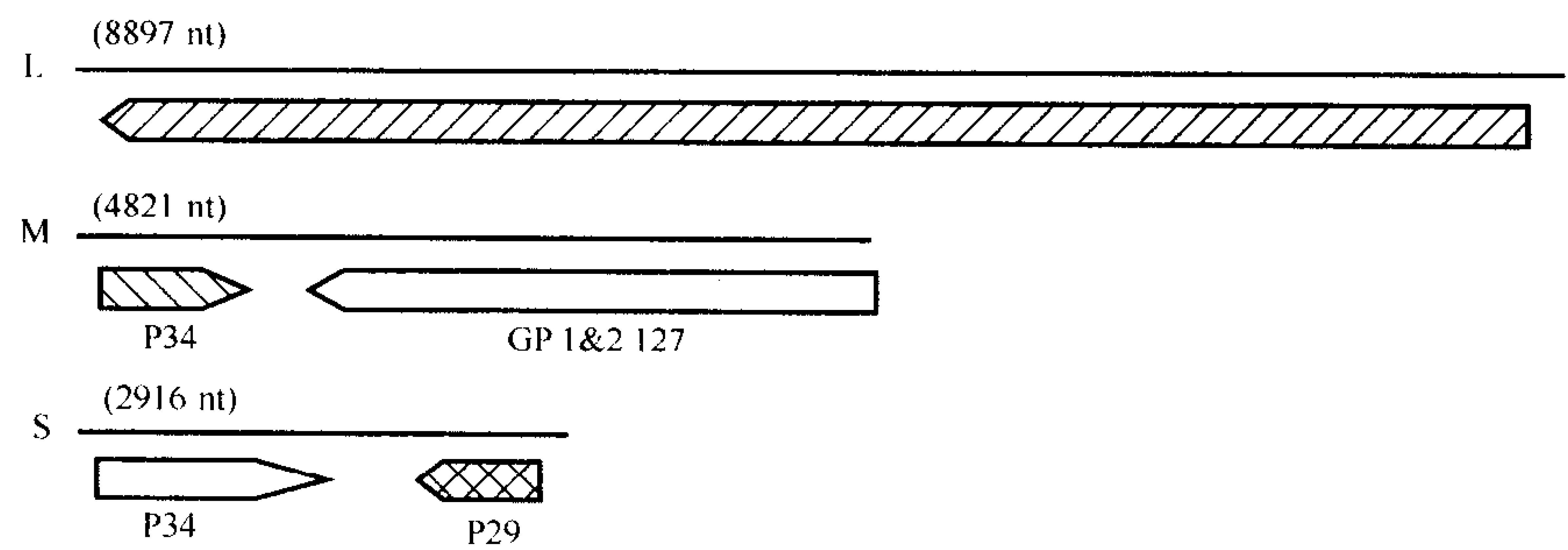


图 6.11　番茄斑萎病毒（TSWV）的基因组组构。单线表示负单链 RNA 基因组节段，最终基因产物的编码区由框标识。箭头显示 C 端。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

2. 纤细病毒属（*Tenuivirus*）（Ramires and Haenni，1994；Falk and Tsai，1998 and Falk，1999）

大多数纤细病毒属病毒（tenuiviruses）的基因组由 4 个 RNA 组成，如图 6.12 所示。一些纤细病毒属病毒（如 RSV 和 RHBV 的一些分离物）具有第 5 个含单一 ORF 的 RNA，然而，还没有确定它是病毒基因组的组成成分还是类似卫星的分子。像番茄斑萎病毒属病毒一样，最大的 RNA（RNA 1）为负链，编码 RNA 聚合酶（337 kDa）；另外 3 条 RNA（RNA 2～RNA 4）每条都含有两个双义排列（ambisense arrangement）的 ORF（图 6.12）。RNA 3 病毒链的 ORF 编码核衣壳蛋白，RNA 4 病毒链的 ORF 编码在受侵染的植物细胞中一种主要的非结构蛋白。这几条 RNA 上的其他 4 个 ORF 产物的功能还不确定。

与其他纤细病毒属病毒不同的是，RGSV 基因组有 6 个片段组成，均为双义排列

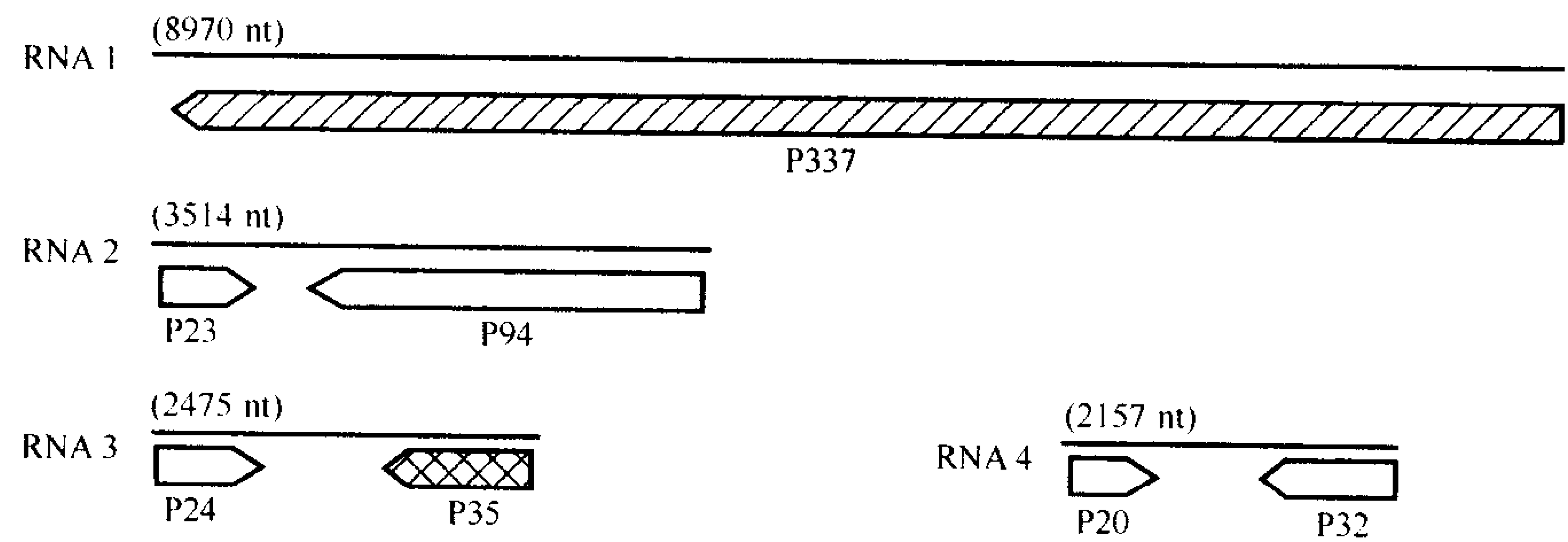


图 6.12　纤细病毒属典型种水稻条纹病毒（RSV）的基因组组构。单线表示负单链 RNA 的基因组节段，最终基因产物的编码区由框标识。箭头显示 C 端。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

（Toryama et al.，1998）。RNA 1 的病毒互补（virus-complementary，VC）序列编码 339 kDa的 RNA 聚合酶。RNA 1 病毒链（V）ORF 的产物（19 kDa）功能未知。RNA 2的 V 与 VC 的 ORF 产物类似于其他纤细病毒属病毒 RNA 2 的产物。然而，除 RNA 5 的 VC ORF 编码核衣壳蛋白外，RNA 3～RNA 6 的 ORF 产物的功能尚不清楚。

3. 蛇状病毒属（*Ophiovirus*）

蛇状病毒属病毒（Ophioviruses）的基因组分为 3 个片段，其大小分别为 7.5～9.0 kb、1.6～1.8 kb 和 1.5 kb。这 3 条 RNA 中的基因的组构尚不清楚。

第Ⅷ节　正义单链 RNA 基因组

如表 4.1 所示，大多数植物病毒的基因组为正义单链 RNA。基因组可以只是一条分子，也可以分为几条分子。

A. 雀麦花叶病毒科（*Bromoviridae*）

1. 雀麦花叶病毒属（*Bromovirus*）（Ahlquist，1999）

a. 基因组结构

BMV 的基因组分为 3 部分，总长为 8243 nt（图 6.13）。此外，含有外壳蛋白的亚基因组 RNA 在染病植物和病毒粒体中都存在。外壳蛋白由 RNA 3 的 3′端序列编码。4 条 RNA 的 5′端均具有帽子结构，3′端含有一段大约 200 nt 的高度保守序列。该序列末端的 135 nt 能折叠成类似于 tRNA 的三维结构（Perret et al.，1989），该结构能接受酪氨酸，就像 tRNA 的氨酰化（aminoacylation）一样，然而该反应可能需要 3′端的 155 nt的参与。

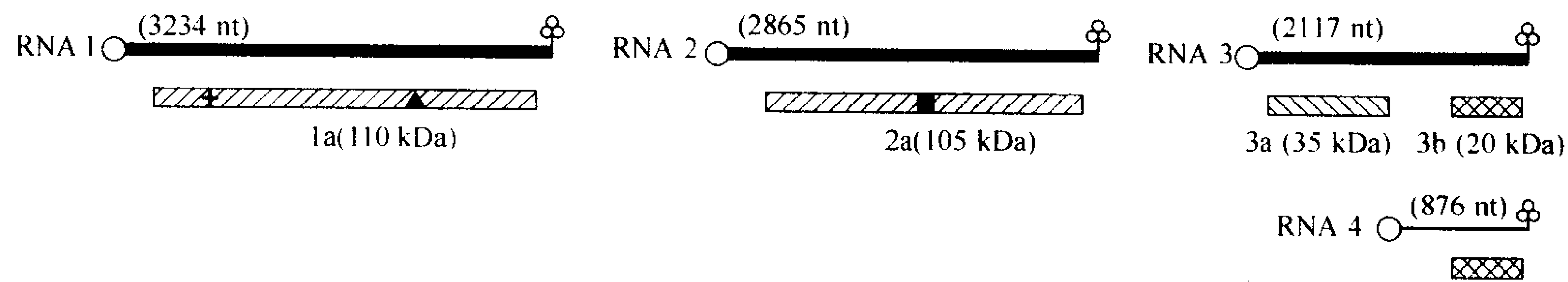


图 6.13　雀麦花叶病毒属的典型种雀麦花叶病毒（BMV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，细线表示亚基因组 RNA 4。5′端圆环表示帽子结构，而 3′端有类 tRNA 结构。+ 表示甲基转移酶模体的位置；▲表示解旋酶模体；■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

BMV 基因组全序列测定早已完成（Ahlquist et al.，1984a）。RNA 1 和 RNA 2 各编码一个蛋白质，分别称为 ORF 1a 和 ORF 2a（图 6.13）。RNA 3 5′端的 ORF 3a 编码一个35 kDa的蛋白质。在该顺反子与外壳蛋白顺反子之间有一个大约 250 nt 的顺反子间的（intercistronic）非编码区。一段长度因种而异（16～22 nt）的 poly(A)出现在该顺反子间的区域末尾，距外壳蛋白基因（ORF 3b）5′端起始有 20 个碱基 。该内部 poly

(A)序列并非 RNA 3 复制所必需。然而，在体内复制过程中，缺少该序列的构建物中就会恢复插入该 poly(A)（Karpova *et al.*，1989）。

BBMV 和 CCMV 的基因组也已被测序（Allison *et al.*，1989；Dzianott and Bujarski，1991；Romero *et al.*，1992）。CCMV 与 BMV 和 CMV 的蛋白质有高度的序列相似性。然而，CCMV RNA 3 的 5′ 非编码区含有一段在其他病毒中都没有的 111 bp 的插入序列。

b. 所编码的蛋白质及其功能

在体外系统中，BMV RNA 是高效的 mRNA。特别是在源自该病毒的寄主植物小麦的胚系统中，RNA 1 合成一条 110 kDa 的多肽，RNA 2 合成一条 105 kDa 的多肽（Shih and Kaesberg，1973），RNA 3 合成一个 35 kDa 的蛋白质（Shih and Kaesberg，1973）。RNA 3 中的外壳蛋白顺反子并不翻译。RNA 4 高效地合成 20 kDa 的外壳蛋白。这是病毒的所有 RNA 中优先被翻译的部分，至少是因为更加有效地与核糖体结合（Pyne and Hall，1979）。在体外，外壳蛋白以特异性方式（可能通过核蛋白的部分装配）抑制 BMV 复制酶对 RNA 的复制（Horikoshi *et al.*，1987）。

烟草原生质体在被 BMV 侵染后，会出现 4 种新的蛋白质，其分子质量分别为：20 kDa（外壳蛋白）、35 kDa、100 kDa 和 107 kDa（Sakai *et al.*，1979）。Okuno 和 Furusawa（1979）也发现了具有同样分子质量的 4 种由 BMV 诱导产生的蛋白质（在凝胶中估计误差的范围内）。在来源于三种植物（一种系统性寄主、一种局部斑寄主和一种非寄主植物）的受侵染的原生质体中都发现了这几个蛋白质。这 4 个蛋白质占病毒基因组的 90%以上。

将 RNA 1 和 RNA 2 单独接种原生质体后能够复制，表明它们含有复制酶功能（Kiberstis *et al.*，1981）。French 等（1986）用克隆的材料证明了，在没有污染的 RNA 3时，RNA 1 和 RNA 2 也能自我复制。RNA 1 和 RNA 2 的蛋白质与复制有关的进一步证据是，其氨基酸序列与其他病毒已知的复制酶或相关蛋白质很相似（参见第 8 章第Ⅳ节 E 部分）。BMV 感染的组织中能分离出有活性的复制酶。Bujarski 等（1982）证明一个在复制酶分级分部中与 RNA 1 的体外翻译产物有相同的电泳迁移率和胰蛋白酶切多肽图的 110 kDa 蛋白质的存在。Quadt 等（1988）合成了 RNA 1 和 RNA 2 编码多肽的 C 端。这些蛋白质的抗体能识别复制酶制备物中相应的天然蛋白质（native protein）。与 RNA 1 多肽特异地反应但不与 RNA 2 反应的抗体完全封闭了复制酶的活性。Horikoshi 等（1988）也获得了相似的结论。

Kroner 等（1989）引入了突变导致 BMV RNA 2 蛋白质（94 kDa）中第 451 和 484 位的氨基酸发生替换，此处为许多正链 RNA 病毒的一个保守区域。有 4 个突变体的 RNA 完全不能复制，还有 5 个突变体在 RNA 复制中有温度敏感（*ts*）缺陷。两个 *ts* 突变体还表现出在许可与非许可温度下，基因组 RNA 的合成量与亚基因组 RNA 相比趋向降低。其他的定点诱变研究表明，BMV RNA 1 和 BMV RNA 2（109 kDa 和94 kDa）的 3 个保守结构域均与 RNA 复制有关（Ahlquist *et al.*，1990）。

正如 Haseloff 等（1984）最初推测的那样，RNA 3 的蛋白质与细胞间移动有关（参见第 9 章第Ⅱ节 D. 2. e 部分）。不存在 RNA 3 的情况下，RNA 1 和 RNA 2 能在原生质体中复制（Kiberstis *et al.*，1981），但是 RNA 3 是系统侵染所必需的，该事实支

持了以上观点。因此，这就确定了从 BMV 基因组翻译的全部 4 种蛋白质的功能。

2. 黄瓜花叶病毒属（*Cucumovirus*）（Roossinck，1999a；1999b）

黄瓜花叶病毒属病毒（cucumoviruses）与雀麦花叶病毒属病毒（bromoviruses）有许多共同的特性。在一个种内，3 个基因组 RNA 与亚基因组 sgRNA 4 的 3′端高度相似，而且能形成像 tRNA 一样的结构并可通过氨酰化接受酪氨酸。基因组组构与雀麦花叶病毒属病毒的类似（图 6.14），但是 3 个基因组 RNA 与编码外壳蛋白的亚基因组 RNA 比较长，并且在 RNA 2 上有一个附加 的 ORF（2b）。ORF 2b 与 ORF 2a 存在 69 个密码子的重叠区（Ding *et al.*，1994），而且是从亚基因组 RNA——RNA 4A 表达出来的。ORF 2b 的产物和细胞核相关（Mayers*et al.*，2000）。基因组的表达产生 5 个蛋白质产物，其中 4 个（翻译自 ORF 1a、2a、3a 和 3b）与雀麦花叶病毒属病毒的相应产物的功能相似。ORF 2b 是病毒的系统性扩散和病害的诱导所必需的（Ding *et al.*，1995），一个 CMV ORF 2b 被 TAV 的相应 ORF 替代的种间杂种病毒比任一亲本病毒的侵染力均显著提高（Ding *et al.*，1996）。如第 10 章第Ⅳ节 F 部分所述，ORF 2b 的这些性质是由其抑制正常的寄主防卫系统的能力所赋予的。

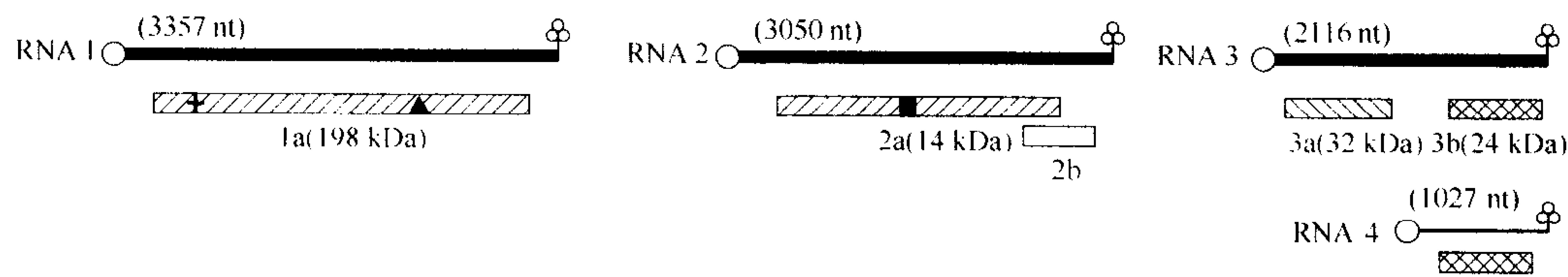


图 6.14　黄瓜花叶病毒属的典型种黄瓜花叶病毒（CMV）基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，细线表示亚基因组 RNA 4。5′端圆环表示帽子结构，而 3′端有类 tRNA 结构。+表示甲基转移酶模体的位置；▲表示解旋酶模体；■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

CMV Fny 株系诱导小西葫芦（zucchini squash）发生迅速而严重的病害的能力是 RNA 1 的一个功能（Roossinck and Palukaitis，1990）。从 CMV 的 3 种 RNA 的全长 cDNA 已经获得了侵染性的 RNA 转录物（Rizzo and Palukaitis，1990）。与雀麦花叶病毒科的其他成员的主要差异是许多 CMV 分离物均伴随着卫星 RNA 的发生（参见第 14 章第Ⅱ节 B.2 部分）。

3. 苜蓿花叶病毒属（*Alfamovirus*）（Bol，1999）

a. 基因组结构

AMV 的基因组为三分体，对第 4 个 RNA 分子为亚基因组外壳蛋白的 mRNA（图 6.15）。这种排列与 BMV 是非常相似的。株系 425 的基因组是第一个全序列得到测定的三分体的 RNA 基因组（Cornelissen *et al.*，1983a，b；Barker *et al.*，1983；Brederode *et al.*，1980）。所有种类的 RNA 均有 M^7G5ppp 帽子结构和一个以-AUGC-OH 结尾的 3′端。它们不能被氨酰化（aminoacylated）。RNA 1 和 RNA 2 各有一个长的 ORF，RNA 1 编码一个 125 kDa 蛋白质，而 RNA 2 编码一个 89 kDa 蛋白质。RNA 3 编码一

个由 300 个氨基酸组成的 35 kDa 蛋白质和外壳蛋白。该外壳蛋白基因在 RNA 4 中重现并得以表达。RNA 3 的前导序列比其余的更长而且包含一个重复 3 次的、长为 28～30 nt的序列。该重复在病毒的所有株系中均存在（Langeris *et al.*，1986b）。除个别核苷酸外，在 3′端的最后 145 个核苷酸在所有的 4 种 RNA 中是相同的。

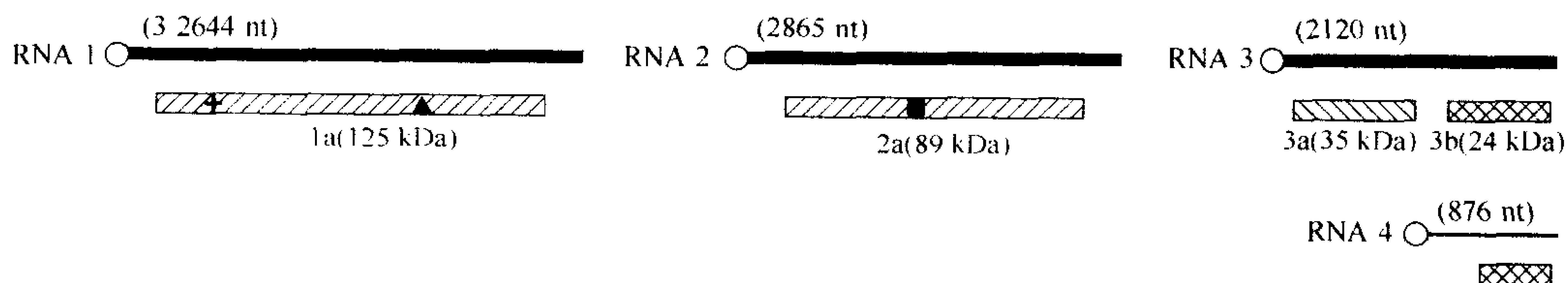


图 6.15 苜蓿花叶病毒（AMV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，细线表示亚基因组 RNA 4。5′端圆环表示帽子结构，而 3′端有类 tRNA 结构。+表示甲基转移酶模体的位置；▲表示解旋酶模体；■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

b. 基因组编码的蛋白质

4 种 RNA 均已在各种不同的无细胞体系（cell-free system）中被翻译。RNA 1 以较低的 mRNA 浓度在兔网织红细胞系统（rabbit reticulocyte system）中指导 115 kDa 蛋白质的合成，在高的 mRNA 浓度时合成 58 kDa 和 62 kDa 两种蛋白质（van Tol and van Vloten-Doting，1979；van Tol *et al.*，1980）。它们如同 115 kDa 蛋白质一样，具有相同的 N 端（图 6.15 中的 125 kDa）。在各种不同的无细胞体系中，RNA 2 被翻译产生一个 84 kDa 蛋白质（Mohier*et al.*，1976）对应于图 6.15 中推断的 89 kDa 蛋白质。在多种体外系统中，来自 RNA 3 的首要翻译产物是与预期的蛋白质相对应的 35 kDa 产物（Dougherty and Hiebert，1985）。RNA 4 在体外被有效地翻译产生病毒的外壳蛋白（Mohier *et al.*，1976）

利用制备的合成肽（对应于 C 端序列）的抗血清，图 6.15 中标出的所有 3 种非结构蛋白质均已在来自 AMV 侵染的烟草叶的一个粗提的膜质部分（membrane fraction）中发现（Berna *et al.*，1986）。

c. 非结构蛋白质的功能

i. 125 kDa 和 89 kDa 蛋白质

下列各项证据表明，125 kDa 与 89 kDa 蛋白质参与 RNA 的复制，推测是作为一个膜包裹的复制酶复合体的一部分：

（1）RNA 1 和 RNA 2 能在原生质体中独立地复制，不需要 RNA 3 的参与（Nassuth *et al.*，1981）。

（2）在接种之后这两种蛋白质的积累时程（time course）与在受侵染的烟草叶中的复制酶活性的上升和下降相对应（Berna *et al.*，1986）。

在受侵染的原生质体中，当病毒增殖达到平台（plateau）时，125 kDa 和 89 kDa 蛋白质在早期可被检测到，随后消失（van Pelt-Heerschap *et al.*，1987b）。

（3）RNA1 和 RNA 2 的突变效果说明它们协同发挥作用（Sarachu *et al.*，1983）。

（4）RNA 1 和 RNA 2 的 *ts* 突变体在病毒的负链 RNA 的合成中是有缺陷的

(Sarachu *et al.*, 1985)。在接种之后 6 h 的一个时期立刻放置于许可温度（permissive temperature）下足以允许负链的正常合成（Huisman *et al.*, 1985）。

（5）在一些其他病毒的 89 kDa 蛋白质的 3 个区域和 RNA 聚合酶的数个区域之间有很高的氨基酸序列相似性（Kamer and Argos，1984）。这些蛋白质的结构和它们在病毒复制中的作用将在第 8 章第Ⅳ节 G 中加以讨论。

ii. 35 kDa 蛋白质

表明 35 kDa 蛋白质参与细胞间转运功能的各种证据包括：

（1）RNA 2 的 *ts* 突变体的研究结果证明有些能在原生质体中增殖，但是烟草叶细胞中不能进行细胞间移动（Huisman *et al.*, 1986）。

（2）该 35 kDa 蛋白质主要局限于受侵染的烟草叶的细胞壁分部中（Godefroy-Colburn *et al.*, 1986）。应用免疫细胞化学技术（immunocytochemical technique），Stussi-Garaud 等（1987）证明 35 kDa 蛋白质在最近受侵染的细胞的中片层中几乎被完全地局部化。该 35 kDa 蛋白质在完全受侵染的细胞中未检测到。然而与 TMV 的情况相反，未能观察到该 35 kDa 蛋白质与胞间连丝的联系。

（3）只包含有 RNA 1 和 RNA 2 的病毒粒体能在原生质体中复制 RNA，但是不能在叶片中进行细胞间移动。

有关蛋白质参与病毒的细胞间移动的情况将在第 9 章第Ⅱ节 D. 2 中进一步讨论。

4. 等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）（Bol，1999）

像雀麦花叶病毒科（*Bromoviridae*）的其他成员一样，等轴不稳环斑病毒属病毒（ilarviruses）的基因组由 3 种 RNA 组成（图 6.16）。在一个病毒种内的这些 RNA 的 3′端非常相似，而且（如 AMV）可形成复合体结构。RNA 1 编码一个蛋白质而 RNA 2 编码两个蛋白质。RNA 1 和 RNA 2 的 5′ORF 编码的蛋白质与雀麦花叶病毒科的其他成员相似，均参与 RNA 的复制。像黄瓜花叶病毒属病毒（cucumoviruses）但是不像雀麦花叶病毒科的其他成员，等轴不稳环斑病毒属病毒 RNA 2 有第二个 ORF 编码大约 22 kDa 从 sgRNA 4a 表达出来的蛋白质 2b（Ge *et al.*, 1997；Xin *et al.*, 1998）。RNA 3的 5′ORF 的产物是细胞间移动蛋白，而该 RNA 的 3′ ORF 是从 sgRNA 4 表达出来的病毒外壳蛋白。像 AMV 一样，等轴不稳环斑病毒属病毒的外壳蛋白为复制的激活所必需的，并且可以与 AMV 的 CP 互换（参见第 8 章第Ⅳ节 G. 4 部分）。

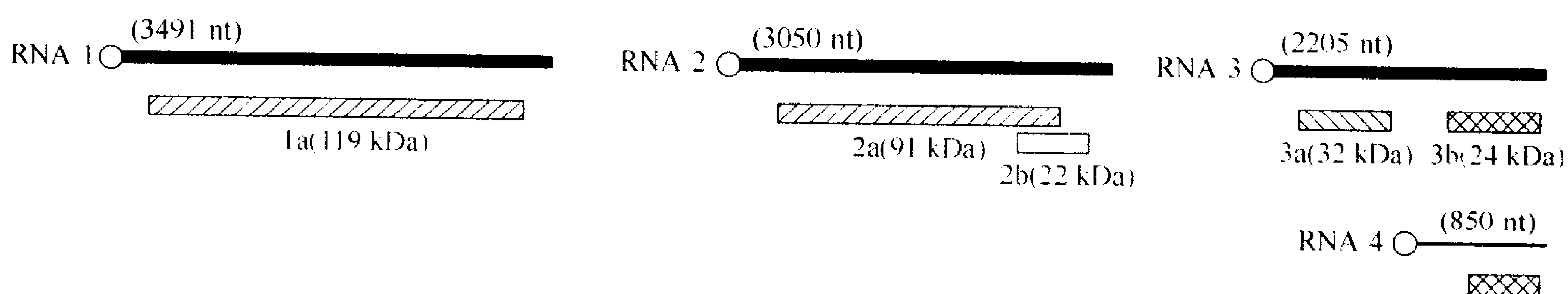


图 6.16 等轴不稳环斑病毒属的典型种烟草线条病毒（TSV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，细线表示亚基因组 RNA 4。5′端圆环表示帽子结构，而 3′端有类 tRNA 结构。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

5. 油橄榄病毒属（*Oleavirus*）

OLV-2 是该属的典型而且唯一的成员，也有一个三分体基因组，其组织方式类似于雀麦花叶病毒科的其他成员（Grieco *et al.*，1995；1996）（图 6.17）。然而，与该科的其他成员显著不同的一点是，其外壳蛋白中包裹的 sgRNA 的水平非常低，或者根本没有。而另外一种与病毒相伴随、由 2073 个核苷酸组成的 RNA，称为 RNA 4，却通常被衣壳化（Grieco *et al.*，1995）。该附加的 RNA 只在个别位置上不同于 RNA 3，但是在体外翻译系统中不产生任何蛋白质。

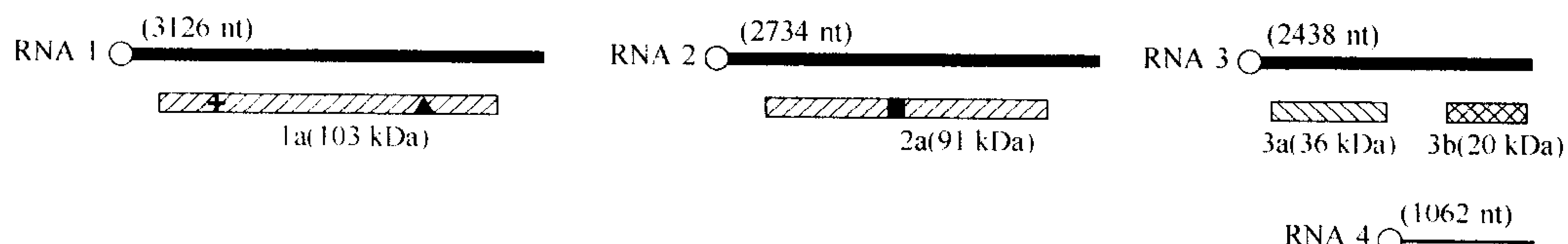


图 6.17　油橄榄潜隐病毒 2 号（OLV-2）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，细线表示亚基因组 RNA 4。5′端圆环表示帽子结构，而 3′端有类 tRNA 结构。+表示甲基转移酶模体的位置；▲表示解旋酶模体；■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

B. 豇豆花叶病毒科（*Comoviridae*）

1. 豇豆花叶病毒属（*Comovirus*）（Goldbach and Wellink，1996；Lomonossoff and Shanks，1999）

a. 基因组结构

CPMV 的基因组由两个正单链 RNA 所组成：B-RNA 和 M-RNA（或 RNA 1 和 RNA 2），大小分别为 5.9 kb 和 3.5 kb。两种 RNA 均有一个小的 VPg 共价连锁于 5′端，而在 3′端有 poly（A）尾巴。M-RNA 的核苷酸全序列被 van Wezenbeek 等（1983）确定，而 B-RNA 的全序列被 Lomonossoff 和 Shanks（1983）测定完成。每种 RNA 均有一个单一的长可读框，B-RNA 编码一个 200 kDa 的蛋白质（图 6.18）。M-RNA 中存在着 3 个 AUG，分别始于第 161、512 和 524 位核苷酸处。利用定点诱变技术，Holness 等（1989）确认在位置 161 的 AUG 在体外可指导 105 kDa 产物的合成。在核苷酸 161 处起始的 105 kDa 蛋白质和在核苷酸 512 处起始的 95 kDa 产物均已在受侵染的原生质体中检测到（Rezelman *et al.*，1989）。如第 7 章第Ⅴ节 E. 8.a 所述，这些多聚蛋白被切割产生一系列的功能产物（图 7.28）。

M-RNA 和 B-RNA 的 5′前导序列的前 44 个核苷酸具有 86%的同源性。在 poly(A) 尾前面的最后 65 个核苷酸序列同源性达 83%。在 poly(A) 序列前的 7 个核苷酸在两种 RNA 中是相同的。这种保守性说明这些序列参与病毒或寄主蛋白质的信号识别。Eggen等（1990）构建了 B-RNA 的一系列突变体包括 3′端的 7 个核苷酸和 poly(A) 序列的前 4 个 A，而且测试了在原生质体和植株中它们对 B-RNA 复制的影响。只有经较少修饰的突变体才能够复制。在植株中复制期间突变体转录物逐步发生回复突变最后变为

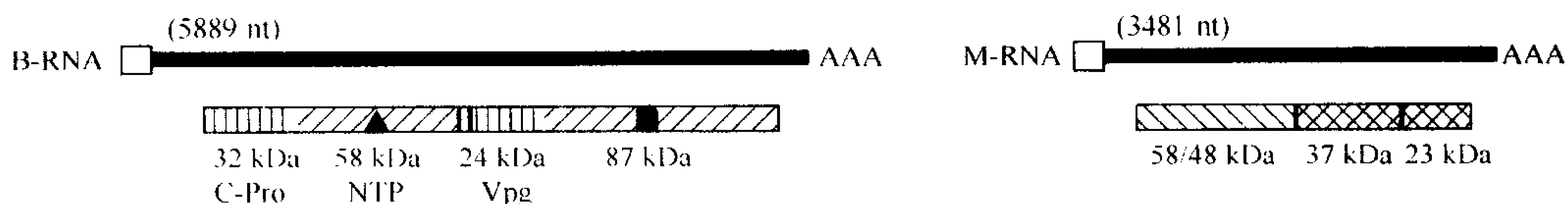


图 6.18 豇豆花叶病毒属的典型种豇豆花叶病毒（CPMV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，5′端□表示有 VPg，AAA 表示 3′端有 poly(A)尾，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

野生型序列。

在 3′ poly(A) 序列前面，两种 RNA 均没有聚腺苷酸信号 AAUAAA。

在复制型（RF）分子中负链的 5′ 端有 poly（U）序列存在，表明 poly(A)序列是在 RNA 复制过程中被转录出来的（Lomonossoff *et al.*，1985）。

b. B-RNA 的部分独立性

B 和 M 病毒粒体，或它们包含的 RNA，（产生后代病毒粒体的）对侵染都是必需的（van Kammen，1968；De Jager，1976）。然而，用 B 组分接种原生质体导致 B 编码的多肽的合成，进而导致 B 组分 RNA 的复制。缺乏 B-RNA 时，MRNA 不能得以复制。因此，B-RNA 编码的蛋白质肯定参与复制，而 M-RNA 编码病毒的结构蛋白。接种到完整叶片上的 B-RNA 在缺乏 mRNA 时不能够移动到周围的细胞中（Rezelman *et al.*，1982）。

c. B-RNA 编码的蛋白质

在体外和体内，B-RNA 均被翻译成一个 200 kDa 的多聚蛋白，后来在特定的位点被蛋白酶解切割，经过一系列的步骤产生功能性的蛋白质；加工途径将在第 7 章第Ⅴ节 E. 8. a 中加以讨论。通过比较分离的蛋白质经蛋白酶解的消化图谱（digestion pattern）和免疫学方法已经建立了原生质体中合成的各种多肽之间的关系（Rezelman *et al.*，1980；Goldbach *et al.*，1981，1982；Zabel *et al.*，1982；Goldbach and Rezelman，1983；Franssen *et al.*，1984a）。除此之外，在受侵染的原生质体中合成的、放射性标记的 CPMV 蛋白质已被分离出来并且其部分氨基酸序列得以确定（Wellink *et al.*，1986）。这可将每个蛋白质的编码序列准确定位于 B-RNA，并准确确定其分子质量和它们从多聚蛋白前体释放的切割位点。切割位点将在第 7 章第Ⅴ节 E. 8. a 描述。

B-RNA 多聚蛋白经切割产生 5 种最终的产物（图 7.28）。这些产物中的两种，N 端的 32 kDa 蛋白质和中间的 24 kDa 蛋白质有蛋白酶活性。58 kDa 蛋白质有核苷酸结合活性，而且 C 端 87 kDa 包含依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶模体。如第 8 章第Ⅳ节 J 所述，这两种蛋白质存在于复制复合体中。在 58 kDa 和 24 kDa 的产物之间，多聚蛋白被加工产生 VPg。

如第 13 章所述，加工的中间产物在复制循环中相当重要，而且复制和加工是高度协调的。

d. M-RNA 编码的蛋白质

M-RNA 多聚蛋白加工的一个模式（scheme）如图 7.28 所示。该多聚蛋白经加工成为 4 种最后的产物，其鉴定是基于体外翻译和 Franssen 等（1982）的加工研究以及

后来的工作。两种成熟的外壳蛋白质是已知的，而且这些蛋白质的 60 kDa 前体已经在受侵染的原生质体中被检测到（ Wellink *et al.*， 1987b）。Franssen 等（1982）的体外研究直接地证明了两个外壳蛋白是由 M-RNA 编码的。该病毒 RNA 只有以病毒粒体的形式才能在植物内系统传播（Wellink and van Kammen，1989）。

Wellink 等（1987b）使用合成肽的抗血清，在受侵染细胞的膜分部（membrane fraction）中发现了一个 M-RNA 编码的 48 kDa 蛋白质。一个在 161 位核苷酸处的 AUG 起始而且与 48 kDa 蛋白质的 C 端序列相同的 58 kDa 多肽在用 CPMV 接种的原生质体中被检测到（Wellink and van Kammen，1989）。在体外检测到一个 95 kDa 蛋白质，它起始于 512 位或 524 位核苷酸处的 AUG（Holness *et al.*， 1989），但是该蛋白质对原生质体中 mRNA 的复制不是必需的。

如上所述，B-RNA 在细胞间的移动依赖于 M-RNA（编码）的一个功能（产物）。除了对外壳蛋白的需求之外，使用插入和缺失突变体的实验已经显示 M-RNA 编码的 48 kDa 蛋白质对细胞间移动是必需的（Wellink and van Kammen，1989）（参见第 9 章第Ⅱ节 D. 2. c）。通过免疫金标记法（immunogold labeling）证明 RCMV 编码的一个 43 kDa蛋白质（对应于 48 kDa 的 CPMV 蛋白质）与胞间连丝相伴随（Shanks *et al.*，1988，1989）。

该 58 kDa 蛋白质的功能尚不清楚，有可能参与复制的控制。

2. 蚕豆病毒属（*Fabavirus*）（Lisa and Boccardo，1996；Cooper，1999）

蚜虫传播的蚕豆病毒属病毒（fabaviruses）有两个 RNA 组分，像豇豆花叶病毒属病毒一样，每个 RNA 均表达成多聚蛋白（图 6.19）。B-RNA 产物的加工细节尚不清楚，但据认为是与豇豆花叶病毒属病毒类似。M-RNA 多聚蛋白的加工可能与豇豆花叶病毒属病毒类似，产生两种外壳蛋白和一种可能参与细胞间移动的蛋白质。

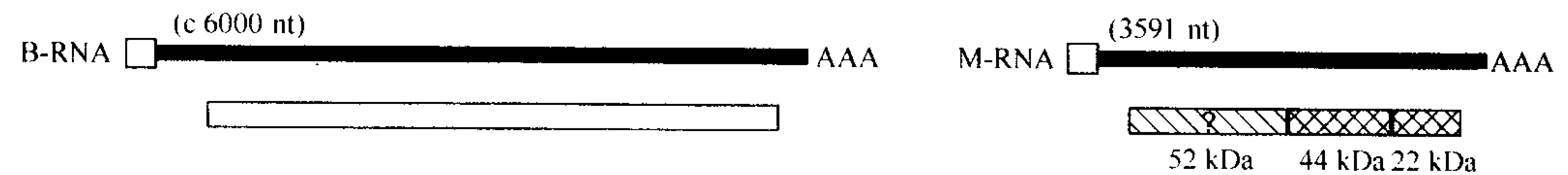


图 6.19 蚕豆病毒属的广藿香轻型花叶病毒（PatMMV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，5′端□表示有 VPg，AAA 表示 3′端有 poly(A)尾，最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

3. 线虫传多面体病毒属（*Nepovirus*）（Mayo and Robinson，1996；Mayo and Jones，1999a）

a. 基因组结构（genome structure）

线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）的基因组是双分体的，由两个正单链 RNA 组成的。较大的 RNA（RNA 1）大小因病毒而异，为 8.1～8.4 kb，而 RNA 2 的长度变化更大，为 3.4～7.2 kb（Murant *et al.*， 1981）。

确定的线虫传多面体病毒属病毒成员根据 RNA 2 的大小和衣壳化区分为 3 个亚组

(subgroup)。亚组 a 成员的 RNA 2 大小为 4.3～5.0 kb 并被包裹于 B 和 M 两个组分中；亚组 b 的 RNA 2 大小为 4.6～5.3 kb 只被包裹于 M 组分中；而亚组 c 的 RNA 2 大小为 6.3～7.3 kb，只被包裹于 M 组分中，并且难以与 B 组分相分离。该属的两个暂定种，SLRSV 和 SDV，不能用该分组法归类。对该属病毒分亚组的另一个方法是，所有的 RNA 2<5 kb 的那些病毒被归为亚组（subgroup）Ⅰ，其余的归为亚组Ⅱ之内（Mayo and Jones，1999a）。两种 RNA 均有一个 3′poly(A)尾，并且均有 VPg 连锁于 5′端，VPg 对侵染性是必需的，但是对体外翻译无用（Chu *et al.*，1981；Mayo *et al.*，1982a）。

b. 基因组组构（genome organization）

像豇豆花叶病毒科的其他属一样，线虫传多面体病毒属病毒的每个 RNA 均编码一个多聚蛋白，经加工产生功能性的基因产物（图 6.20）。其基因组组构与豇豆花叶病毒属病毒类似，主要的不同在于产物的大小和外壳蛋白的加工。例如，线虫传多面体病毒属病毒确定成员的外壳蛋白是 52～60 kDa 的单一多肽，而暂定种包含两个多肽（为 40～47 kDa 和21～27 kDa）或大小为 20～27 kDa 的 3 个多肽。

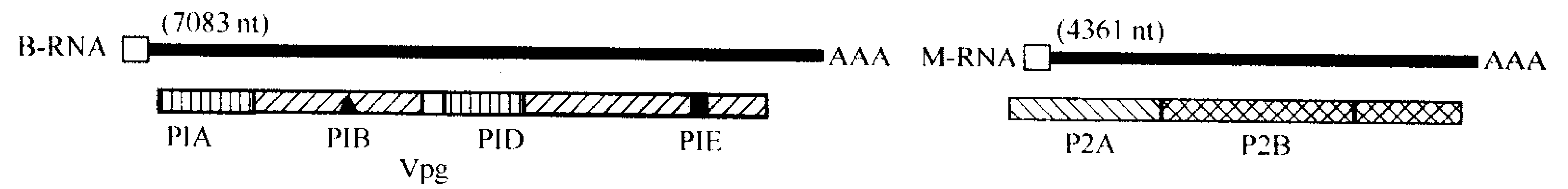


图 6.20　线虫传多面体病毒属的甜菜环斑病毒（BRSV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，5′端□表示有 VPg，AAA 表示 3′端有 poly(A)尾，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

C. 马铃薯 Y 病毒科（*Potyviridae*）（Shukla *et al.*，1994；López-Moya and Garcia，1999）

马铃薯 Y 病毒科成员的病毒粒体为柔条线状，基因组为 ss（＋）（正单链）RNA，长度为 8.5～10 kb。该科有 5 个属的基因组都是单组分的，只有大麦黄花叶病毒属（*Bymovirus*）的是两组分的。所有属的基因组 5′端均有一个 VPg，3′端含有 poly(A)尾。

1. 单组分的马铃薯 Y 病毒科病毒

大多数研究集中于马铃薯 Y 病毒属（*Potyvirus*）成员，对马铃薯 Y 病毒科其他几个单组分的属［柘橙病毒属（*Macluravirus*）、甘薯病毒属（*Ipomovirus*）、小麦花叶病毒属（*Tritimovirus*）以及黑麦草花叶病毒属（*Rymovirus*）］的研究不多，但它们都有着相似的基因组结构（genome structure）和组构（organization），只有细微的差别。

a. 基因组结构

烟草蚀纹病毒（TEV）基因组的主要特点（图 6.21）：①5′端有约为 24 kDa 的 VPg；②5′端有长 144 nt 富含 A、U 的非编码区；③由 9161 nt 组成的单个大 ORF，启始于 145～147 nt，编码一个大约由 3000 个氨基酸组成的多聚蛋白，分子质量约为

340 kDa；④3′非翻译区由 190 个核苷酸组成，并有一个 20～160 个腺苷酸的构成的 poly(A)尾。基因组编码的多聚蛋白由病毒编码的蛋白酶切割为 9 或 10 个蛋白质产物（加工途径参见第 7 章第Ⅴ节 B. 1）。

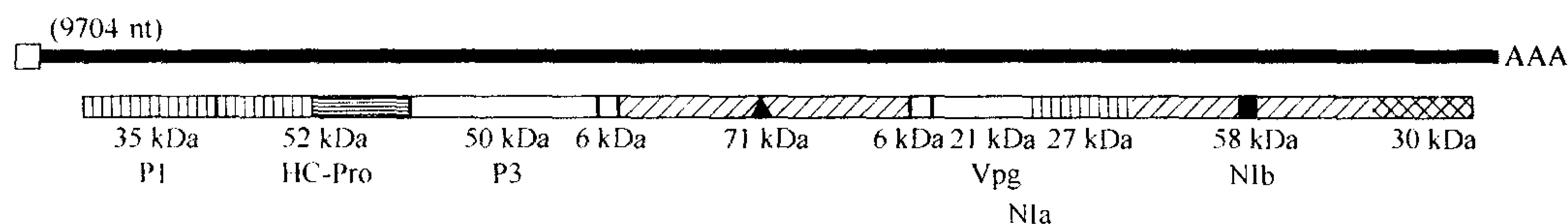


图 6. 21　马铃薯 Y 病毒属的烟草蚀纹病毒（TEV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，5′端□表示有 VPg，AAA 表示 3′端有 poly(A)尾，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6. 1。

b. 基因产物

i. 病毒粒体中的蛋白质

TEV 的外壳蛋白亚基为 30 kDa，位于多聚蛋白的 C 端，大约 2000 个蛋白亚基装配成一个完整的杆状病毒粒体（图 7. 16）。外壳蛋白还参与马铃薯 Y 病毒属病毒的蚜虫传播（Shaw *et al.*，1990）（参见第 11 章第Ⅲ节 E. 7）。此外，单分子的 VPg 蛋白共价结合在基因组的 5′端，它是从位于多聚蛋白的中部加工释放出来的（图 6. 21）。

ii. 细胞质风轮状内含体蛋白

在马铃薯 Y 病毒科所有成员包括由螨类介导传播的那些病毒（Brakke *et al.*，1987a）侵染后的植物细胞质中，都可以发现由蛋白质单体聚合而成的特征性风轮状内含体（Edwardson，1974）（图 3. 10）。这种蛋白质被称为细胞质内含体（cytoplasmic inclusion，CI）蛋白，体外转录研究表明，这种蛋白质是由病毒编码的（Dougherty and Hiebert，1980）。TEV 的 CI 蛋白的分子质量约为 70 kDa 。以前有人认为 CI 可能参与病毒的胞间移动（Langenberg，1986a），但是现在看来不太可能。通过与小核糖核酸 RNA 病毒（picornavirus）和豇豆花叶病毒属病毒（comoviruses）中类似蛋白质的氨基酸序列相似性分析，现在认为它可能参与 RNA 的复制（参见第 8 章第Ⅳ节 I）。应特别指出的是，它具有一个高度保守的 NTP 结合模体（NTP binding motif）。

iii. 细胞质无定形内含体蛋白和辅助组分蛋白

在一些（并非全部）马铃薯 Y 病毒属病毒（potyviruses）侵染的植物中已经检测到这种细胞质内的无定形内含体蛋白。辅助组分蛋白由病毒编码，是蚜虫介导的病毒传播所必需的（参见第 11 章 第Ⅲ节 E. 7）。多个证据显示两者完全或部分是相同的蛋白质，且其基因已被定位于基因组的 5′区域：①它们在凝胶电泳中共迁移；②无定形内含体蛋白抗体与辅助蛋白提取物纯化得到的主要蛋白质发生反应；③部分纯化得到的辅助组分的抗血清不仅封闭同源的辅助组分的生物活性，而且可以与从同源 RNA 得到的 75 kDa 的无细胞翻译产物发生反应；④无定形内含体蛋白和 5′胞外翻译产物拥有相似的部分蛋白酶解模式（de Mejia *et al.*，1985；Thornbury *et al.*，1985）。在所有蚜虫介导传播的马铃薯 Y 病毒属病毒中，已经完成测序的辅助组分（helper component，HC）蛋白质，都具有一个潜在的“锌指”金属离子结合位点，目前还不清楚其功能（Robaglia *et al.*，1989）。辅助组分的活性定位于 5′端附近区域编码的 52 kDa 蛋白质

（图 6.21）。

iv. 细胞核内含体蛋白

在TEV 和其他一些马铃薯 Y 病毒属病毒侵染中发现一种细胞核内含体（nuclear inclusion，NI）蛋白，它由大约 48 kDa（NIa）和 58 kDa（NIb）的两种蛋白质组成。所有马铃薯 Y 病毒属病毒都编码这些蛋白质，但只有一部分病毒会形成这种内含体。TEV 的 NIa 蛋白是一种由病毒编码的蛋白酶，与丝氨酸蛋白酶的胰蛋白酶超家族有关，它通过自我蛋白酶切（autoproteolysis）从多聚蛋白上切割下来（Carrington and Dougherty，1987a，b）。它还负责基因组 3′端 2/3 部分的其他 4 处切割（参见第 7 章第Ⅴ节 B.1）。NIb 蛋白与其他一些病毒的聚合酶有序列相似性（Allison *et al.*，1986；Domier *et al.*，1987），并且是依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（参见第 8 章第Ⅳ节 I）。

v. 蛋白酶

马铃薯 Y 病毒属病毒编码三种蛋白酶参与多聚蛋白的加工，它们分别是多聚蛋白 N 端 35 kDa 的 P1 蛋白、52 kDa Hc-Pro 蛋白的 N 端部分和 NIa 蛋白的 27 kDa 的 C 端部分。这些蛋白酶的性质以及它们在加工多聚蛋白过程中发挥的作用将在第 7 章第Ⅴ节 B.1.a 中介绍。

2. 大麦黄花叶病毒属（*Bymovirus*）

大麦黄花叶病毒（BaYMV）的 RNA 已经完成测序（Kashiwazaki *et al.*，1990；1991），它编码的基因组组构与单组分的基因组相似，但是被分成两个节段（segment）（图 6.22）。基本上 RNA 2 编码的多聚蛋白包含马铃薯 Y 病毒属病毒的多聚蛋白 N 端的两个产物，RNA 1 编码的多聚蛋白则加工为其他产物。

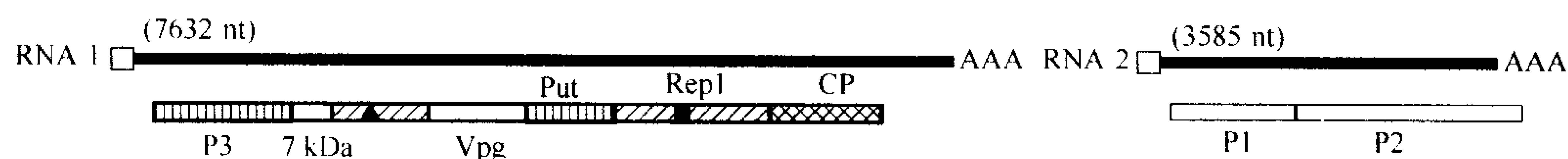


图 6.22 大麦黄花叶病毒（BaYMV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，5′端□表示有 VPg，AAA 表示 3′端有 poly(A)尾，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

D. 番茄丛矮病毒科（*Tombusviridae*）

除了香石竹病毒属（*Dianthovirus*）外，番茄丛矮病毒科其他成员的基因组都是单组分正单链 RNA；香石竹病毒属病毒（dianthoviruses）的基因组为双组分正单链 RNA。此科病毒 RNA 的 3′端无 poly（A）尾。在香石竹斑驳病毒（CarMV）、红三叶草坏死花叶病毒（RCNMV）和玉米褪绿斑驳病毒（MCMV）的 5′端存在帽子结构，虽然其他属的 5′端也受到保护，但未发现帽子结构。此外，在 RNA 体外转录物上加一个类似的帽子结构，只能略微或根本不能增强其侵染性（Lommel *et al.*，2000）。

1. 番茄丛矮病毒属（*Tombusvirus*）（Rochon，1999）

番茄丛矮病毒（TBSV）的基因组 RNA 已经由 Hearne 等（1990）完成测序，它包括 4 个 ORF（图 6.23）。ORF 1 编码一个 33 kDa 蛋白质，其琥珀终止密码子（UAA）通读后产生一个 92 kDa 蛋白质。这两种蛋白质已经在体内检测到，并且可由病毒成熟粒体的 RNA 经体外翻译得到。两者共同形成病毒的聚合酶。ORF 2 的产物是 41 kDa 的外壳蛋白，由亚基因组 RNA 1（sgRNA 1，2.2 kb）表达。ORF 3 和 ORF 4 在体内由亚基因组 RNA 2 表达产生。ORF 3 的产物与膜相连，并且促进病毒的胞间移动（Scholthof *et al.*，1995；Chu *et al.*，1999）。ORF 4 的产物（19 kDa）负责调控坏死的形成和寄主依赖性系统侵染的诱导（Scholthof *et al.*，1995；Chu *et al.*，2000）。p19 参与在本生烟（*Nicotiana benthamiana*）和克里夫兰烟（*N. clevelandii*）上的系统坏死反应；但在菠菜上，极大量的 p19 才产生有效的系统侵染。此蛋白质的 N 端介导依赖于寄主的活性，中心部分是全部活性所必需的。由于 ORF 3 的起始密码子位于次佳的前后序列（suboptimal context）中，通过核糖体扫描使 sgRNA 2 上的 ORF 4 得以翻译。

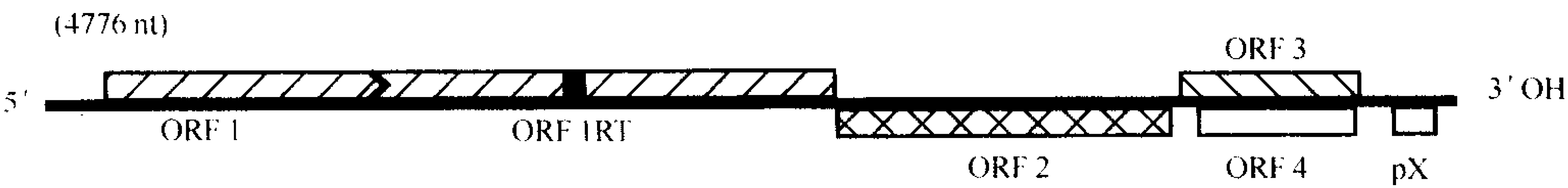


图 6.23 番茄丛矮病毒属的典型种番茄丛矮病毒（TBSV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，■表示 RdRp 模体，➤表示终止密码子的通读。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

2. 绿萝病毒属（*Aureusvirus*）

绿萝潜隐病毒（PoLV）的基因组已完成测序，并确定了基因组组构（图 6.24）（Rubino *et al.*，1995）。病毒 RNA 含 4 个 ORF。ORF 1 在其 5′端编码一个 25 kDa 蛋白质；弱终止密码子通读后形成一个 84 kDa 产物，其 C 端有一个依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶模体。这两个产物参与组成病毒聚合酶复合体。ORF 2 的 40 kDa 的产物是外壳蛋白；ORF 3 产物（27 kDa）是细胞间移动蛋白；ORF 4 的产物（14 kDa）与症状严重度（symptom severity）相关（Rubino and Russo，1997）。外壳蛋白调控 ORF 4 的表达，因为 14 kDa 蛋白质的过量表达可使植物致死。

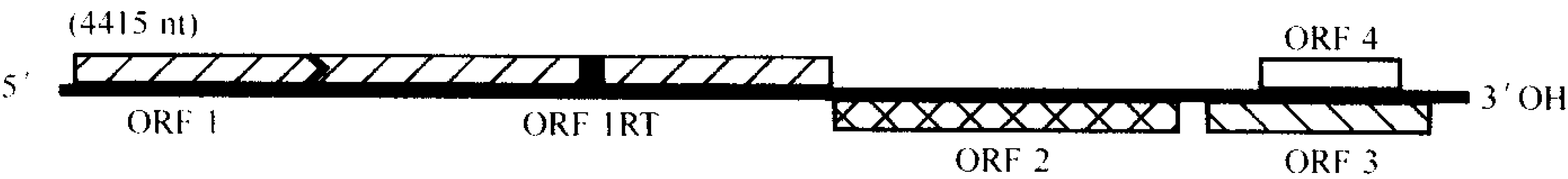


图 6.24 绿萝潜隐病毒（PoLV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，■表示 RdRp 模体，➤表示终止密码子的通读。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

ORF 2 通过一个 2.0 kb 的 sgRNA 表达，而 ORF 3 和 ORF 4 通过一个 0.8 kb 的 sgRNA 表达。

3. 燕麦病毒属 (*Avenavirus*)

燕麦褪绿矮化病毒（OCSV）基因组 RNA 序列显示有 3 个 ORF（Boonham *et al.*，1995）（图 6.25）。ORF 1 编码一个 23 kDa 蛋白质，其琥珀终止密码子通读后形成一个 84 kDa 蛋白质。ORF 1 的这两个蛋白质参与形成病毒复制酶复合体，84 kDa 蛋白质在其 C 端有 RdRp 模体。ORF 2 编码 48 kDa 的外壳蛋白。ORF 3 位于 ORF 2 内部，但它是不同的可读框，其 8 kDa 产物可能参与胞间移动。ORF 2 和 ORF 3 是由一个亚基因组 mRNA 表达的，该亚基因组 RNA 可被包壳于病毒粒体中。

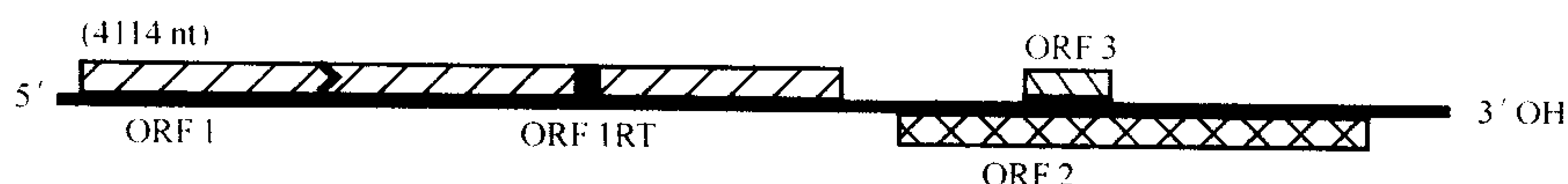


图 6.25 燕麦褪绿矮化病毒（OCSV）的基因组结构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，■表示 RdRp 模体，❯ 表示终止密码子的通读。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

4. 香石竹斑驳病毒属 (*Carmovirus*) (Qu and Morris，1999)

香石竹斑驳病毒（CarMV）的全部核苷酸序列已确定（Guilley *et al.*，1985），它编码 4 个 ORF（图 6.26）。在第一个 AUG 上游有一个 69 nt 的 5′前导序列。UAG 密码子终止翻译，生成一个 28 kDa 的蛋白质，但如果它被通读至 UAA 密码子，将得到一个 86 kDa 的蛋白质。在体内、体外均可发现 28 kDa 和 86 kDa 的存在。ORF 1 的两种蛋白质构成病毒的聚合酶。ORF 2 的产物（7 kDa）可促进病毒在细胞间的移动，而 ORF 3 的产物（9 kDa）则参与病毒的系统移动。将芜菁皱缩病毒（TCV）的这两种蛋白质与绿色荧光蛋白融合进而定位的实验显示，p9 遍布于细胞质中，细胞核内也有，而 p8（ORF 3 的产物）被局限在细胞核内（Cohen *et al.*，2000）。p8 的序列分析揭示了两个核定位信号（nuclear localization signal），但它们并不是细胞间移动所必需的。ORF 4 编码 38 kDa 的外壳蛋白。随后是 290 nt 的 3′非编码区。

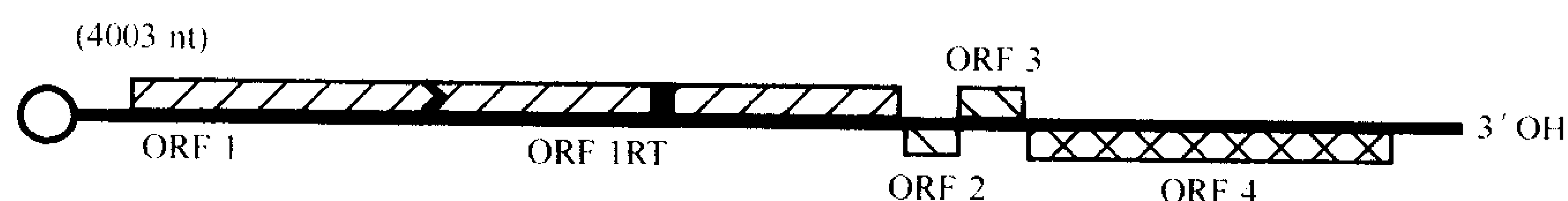


图 6.26 香石竹斑驳病毒属的典型种香石竹斑驳病毒（CarMV）的基因组结构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，○表示 5′帽子结构，■表示 RdRp 模体，❯ 表示有终止密码子的通读。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

除基因组 RNA 以外，体内条件下还生成两个大小分别为 1.7 kb 和 1.45 kb 的亚基因组 RNA 并被包壳于病毒粒体中（Carrington and Morris，1984）。它们和基因组

RNA 具有共同的 3′端，它们分别是 ORF 2、ORF 3 和 ORF 4 的 mRNA。其 5′端已经被精确定位（Carrington and Morris，1986）。

5. 玉米褪绿斑驳病毒属（*Machlomovirus*）（Lommel，1999b）

玉米褪绿斑驳病毒（MCMV）的基因组 RNA 包括 4 个 ORF（Lommel *et al.*，1991）（图 6.27）。ORF 1 编码一个功能未知的 32 kDa 蛋白质。ORF 2 的 N 端部分编码一个 50 kDa 蛋白质，琥珀终止密码子通读后继续翻译得到一个 111 kDa 的产物。ORF 2 的这两个产物组成病毒的聚合酶。ORF 3 的 N 端部分形成一个 9 kDa 蛋白质，其乳白终止密码子通读后得到一个 33 kDa 产物。ORF 3 的这两个产物的功能尚不清楚。ORF 4 由一个 1.1 kb 的 sgRNA 表达，生成 25 kDa 的外壳蛋白。



图 6.27 玉米褪绿斑驳病毒（MCMV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，○表示 5′帽子结构，■表示 RdRp 模体，➤ 表示有终止密码子的通读。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

6. 坏死病毒属（*Necrovirus*）（Meulewaeter，1999）

烟草坏死病毒（TNV）的几个株系和其他一些坏死病毒属病毒（necroviruses）的基因组 RNA 已完成测序（Meuleweiter *et al.*，1990；Coutts *et al.*，1991；Lot *et al.*，1996；Molnar *et al.*，1997）。该属成员的基因组组构可以用 TNV-A 为例加以说明（图 6.28）。TNV-A 的基因组包括 5 个 ORF。ORF 1 的 N 端部分编码一个 23 kDa 蛋白质；琥珀终止密码子通读后形成一个 82 kDa 蛋白质，在其 C 端区域有一个 RdRp 模体。ORF 2 和 ORF 3 由亚基因组 RNA 1（1.6 kb）表达。ORF 2 的产物（8 kDa）参与细胞间的移动；ORF 3 的产物（6 kDa）功能尚不明确。ORF 4 编码的 30 kDa 的外壳蛋白以及 3′端的 ORF 5 编码的 7 kDa 蛋白质都是通过亚基因组 RNA 2（1.3 kb）表达的；7 kDa 蛋白质具有核酸结合特性（Offei *et al.*，1995）。

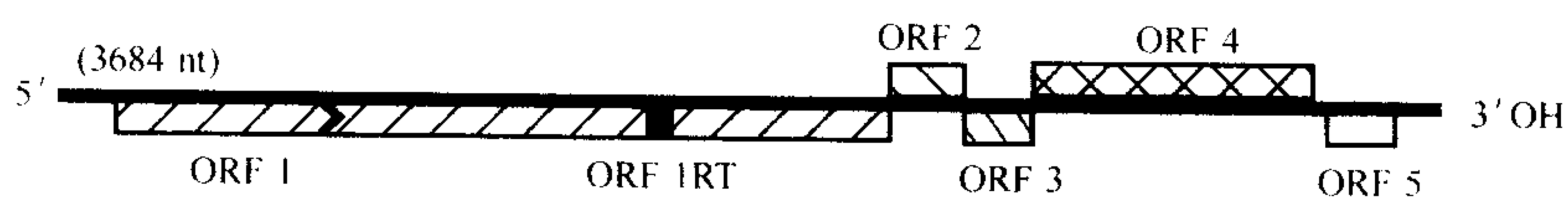


图 6.28 坏死病毒属的典型种烟草坏死病毒 A 株系（TNV-A）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，■表示 RdRp 模体，➤ 表示有终止密码子的通读。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

7. 黍病毒属（*Panicovirus*）

黍花叶病毒（PMV）的基因组 RNA 已测序完成（Turina *et al.*，1998），它包括 5

个 ORF（图 6.29）。ORF 1 的 N 端部分编码一个 48 kDa 蛋白质，其琥珀终止密码子通读后形成一个 112 kDa 蛋白质。这两种蛋白质均可由病毒粒体 RNA 在体外翻译产生，具有病毒聚合酶的功能。ORF 2 编码一个 8 kDa 蛋白质，此蛋白由亚基因组 RNA 1（1.5 kb）转录物体外翻译得到。从 ORF 2 到 ORF 3（6.6 kDa）的－1 移码突变，将生成一个 14.6 kDa 蛋白质，它在亚基因组 RNA 体外翻译中也是可以检测到的。ORF 2 和 ORF 2＋ORF 3 的这两个产物被认为可能参与细胞间移动。ORF 4 编码 26 kDa 的外壳蛋白，而外壳蛋白也被认为是由 1.5 kb 的亚基因组 RNA 表达的。ORF 5（15 kDa）包含在 ORF 4 内部，但可读框不同，也被认为是由亚基因组 RNA 1 表达的；ORF 5 的产物功能尚不清楚。人工诱变显示 PMV 对黍类植物（millet plant）的系统侵染依赖于 p8、p6.6、p15 和外壳蛋白等基因的协同表达（Turina *et al.*，2000）。



图 6.29　黍花叶病毒（PMV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，■表示 RdRp 模体，➤表示有终止密码子的通读。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

8. 香石竹病毒属（*Dianthovirus*）（Lommel，1999a）

香石竹病毒属病毒与番茄丛矮病毒科的其他成员的不同之处在于其基因组由两个 RNA 节段 RNA 1 和 RNA 2 组成。香石竹环斑病毒（CRSV）的核苷酸序列显示，RNA 1 有两个大 ORF，RNA 2 中有一个 ORF（图 6.30）。RNA 1 的 ORF 1 编码一个 27 kDa蛋白质，当发生－1 移码突变（参见第 7 章第Ⅴ节 B.10.a）时，可翻译得到一个 88 kDa蛋白质。这两种蛋白质都可以在体内和体外观察到，两者形成病毒的聚合酶。ORF 2 的产物是大小为 38 kDa 的外壳蛋白，它是由一个 1.5 kb 的亚基因组 RNA 表达的（Xiong and Lommel，1989）。RNA 2 的 ORF 2/1 编码的 35 kDa 产物是细胞间移动蛋白（参见第 9 章第Ⅱ节 D.2）。

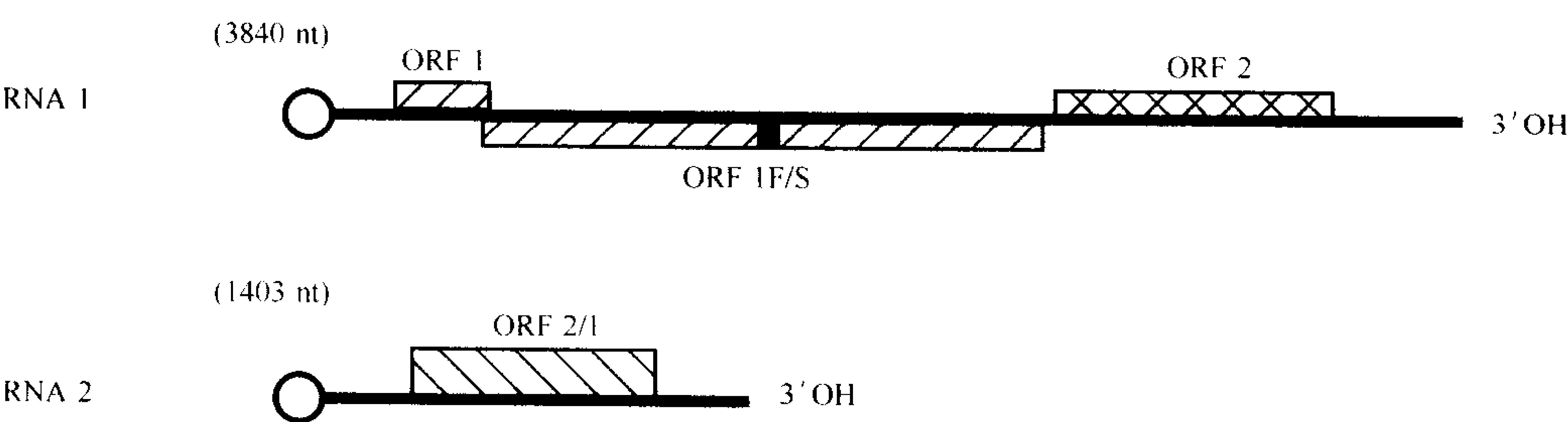


图 6.30　香石竹病毒属的典型种香石竹环斑病毒（CRSV）的基因组组构。粗体线代表正单链 RNA 基因组节段，○表示 5′帽子结构，■表示 RdRp 模体，最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

E. 伴生病毒科（*Sequiviridae*）

伴生病毒科的成员拥有较大的 RNA 基因组（10～12.5 kb），5′端有 VPg，3′端有 poly(A)尾。其基因组信息以多聚蛋白的形式表达，并由病毒编码的蛋白酶完成剪切。

1. 伴生病毒属（*Sequivirus*）（Mayo and Murant，1999）

欧防风黄点病毒（PYFV）的基因组为 9.9 kb 的正单链 RNA（Turnbull-Ross *et al.*，1993），只有一个表达一个多聚蛋白的 ORF（图 6.31）。虽然对于该多聚蛋白的加工过程还不太了解，但是 3 种外壳蛋白的切割位点已经确定，并且还发现了蛋白酶和 RdRp 的模体。

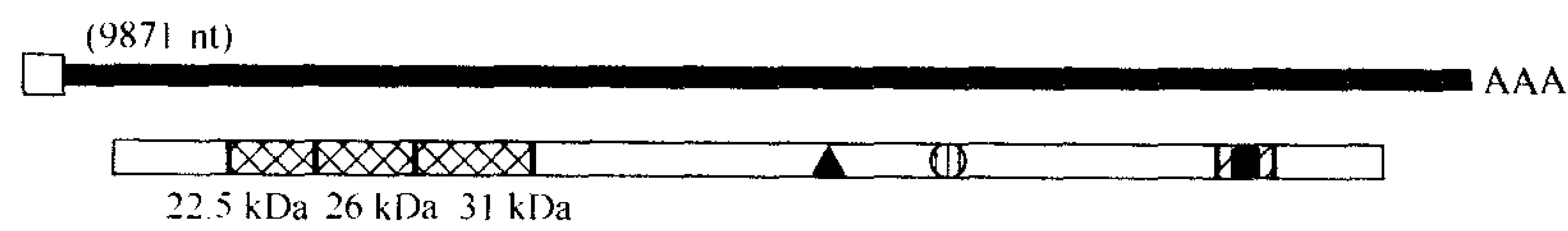


图 6.31　伴生病毒属的典型种欧防风黄点病毒（PYFV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组节段，5′端□表示有 VPg，AAA 表示 3′端有 poly(A)尾，▲表示解旋酶模体，最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

2. 矮化病毒属（*Waikavirus*）（Hull，1996；Gordon，1999）

水稻东格鲁球状病毒（RTSV）和玉米褪绿矮缩病毒（MCDV）的基因组序列已测定（Shen *et al.*，1993；Thole and Hull，1996；Reddick *et al.*，1997）。RTSV 的基因组组构如图 6.32 所示。12.4 kb 的 RNA 编码一个 393 kDa 多聚蛋白，并且 Shen 等（1993）推测 3′端存在两个小 ORF。可是，Thole 和 Hull（1996）却检测不到所推断的小 ORF 的产物。多聚蛋白许多方面的特点已经确定。三种外壳蛋白的 N 端边界已经在多聚蛋白图上表示出来（Shen *et al.*，1993；Zhang *et al.*，1993）。由于这些蛋白质在多聚蛋白中相毗邻，CP1 和 CP2 的 C 端已定位，但是 CP3 的 C 端尚未确定。RTSV CP3 有不正常的特性，提纯的病毒蛋白质经凝胶电泳可得到一个 33 kDa 的分子，但是对受侵染植物的提取物的免疫探测（immunoprobing）只检测到 40～42 kDa 范围的一些蛋白质（Druka *et al.*，1996）。因为 C 端不能确定，我们还不能认定这种差异应归因于纯化中的处理还是一些翻译后修饰引起的差异。Thole 和 Hull（1998）发现 35 kDa 蛋白质具有类丝氨酸蛋白酶（serine-like proteinase）的性质（参见第 7 章第Ⅴ节 B.1.a），并确定 70 kDa 的聚合酶编码区位于基因组 3′端。

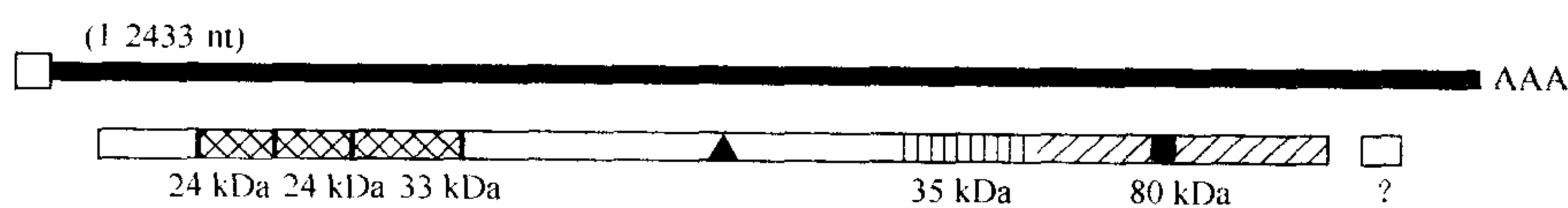


图 6.32　矮化病毒属的典型种水稻东格鲁球状病毒（RTSV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组节段，5′端□表示有 VPg，AAA 表示 3′端有 poly(A)尾，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

F. 长线病毒科（*Closteroviridae*）（German-Retana *et al.*，1999）

长线病毒科的成员为植物正链 RNA 病毒中基因组最大的病毒，其中柑橘速衰病毒（CTV）的基因组长达 19.3 kb。该科现有两个属：单组分 RNA 的长线病毒属（*Closterovirus*）和双组分 RNA 的毛病毒属（*Crinivirus*）。

1. 长线病毒属（Dolja *et al.*，1994；Bar-Joseph *et al.*，1997；German-Retana *et al.*，1999）

蚜虫传播的甜菜黄化病毒（BYV）（15.5 kb）和 CTV（19.3 kb）（Agronovsky *et al.*，1994；Karasev *et al.*，1995），粉蚧传播的小樱桃病毒（LCV）（16.9 kb）（Jelkmann *et al.*，1997）以及葡萄卷叶伴随病毒 1 号（GLRaV-1）的基因组（12.4 kb）（Fazeli and Rezaian，2000）均已完成测序。RNA 的 5′端可能有帽子结构，3′端无 poly(A)尾。

该科的典型成员 BYV 的序列显示有 9 个 ORF（图 6.33），其特性归纳在表 6.5 中。CTV 的序列包含 12 个 ORF，其特点也列于表 6.5。CTV 中多出的两个 ORF，一个紧跟在编码复制酶的 ORF 1b 下游，编码一个 33 kDa 蛋白质。另一个在 3′端，编码一个 26 kDa 蛋白质。这两种病毒所有 ORF 的组构和功能，本质上都可分为 4 组：一组属于复制酶，一组与细胞间移动有关，一组参与病毒粒体装配，而另一组功能未知。

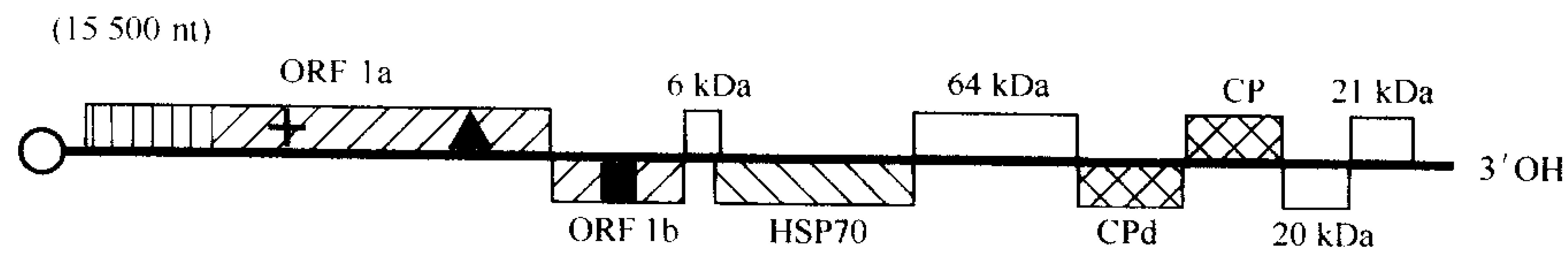


图 6.33 长线病毒属的典型成员甜菜黄化病毒（BYV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组，5′端圆圈表示帽子结构，+ 表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

表 6.5 长线病毒属病毒（closteroviruses）**及毛形病毒属病毒**（criniviruses）**的可读框的特征**

ORF	BYV		CTV		LIYV		
	大小/kDa	功能	大小/kDa	功能	ORF[a]	大小/kDa	功能
1a	295	P-pro，MT，Hel	349	P-pro，MT，Hel	1/1a	217	P-pro，MT，Hel
1b	48	Pol	57	Pol	1/1b	55	Pol
2	6	Mb	33	ND	1/2	32	ND
3	65	HSP70h	6	Mb	2/1	5	Mb
4	64	(HSP90)	65	HSP70h	2/2	62	HSP70h
5	24	CPm	61	ND	2/3	59	ND

续表

ORF	BYV		CTV		LIYV		
	大小/kDa	功能	大小/kDa	功能	ORF[a]	大小/kDa	功能
6	22	CP	27	CPm	2/4	9	ND
7	20	ND	25	CP	2/5	28	CP
8	21	ND	18	ND	2/6	52	CPm
9			13	ND	2/7	26	ND
10			20	ND			
11			23	NAb			

注：a. ORF 的名称：RNA 节段/ORF 号码。缩写：CP，外壳蛋白；CPm，外壳蛋白类似物（analogue），次要 CP（minor coat protein）；Hel，解旋酶；HSP90，热激蛋白 90 类似物；HSP70h，热激相关蛋白（heat-shock-related protein）；Mb，膜结合蛋白；MT，甲基转移酶；Nab，核酸结合蛋白；ND，待定；P-pro，类似木瓜蛋白酶的蛋白酶（papain-like proteinase）。

数据来自：BYV：Agranovsky 等（1991；1994）；CTV：Pappu 等（1994），Karasev 等（1995）；LIYV：Klaassen 等（1995），均经允许。

a. 复制酶

ORF 1a 的产物其结构域具有木瓜蛋白酶、甲基转移酶和解旋酶的特性；ORF 1b 的产物具有一个 RdRp 结构域。ORF 1b 被认为是由 ORF 1a 的+1 位核糖体移码而表达产生的，生成一个 348 kDa 融合蛋白。

b. 外壳蛋白

BYV 的 ORF 5、ORF 6 以及 CTV 的 ORF 6、ORF 7 均表达两个外壳蛋白。下游的蛋白质（CP）是主要的外壳蛋白，负责包裹病毒粒体的大部分。上游的蛋白质（CPm）是次要外壳蛋白，负责包裹粒体的 5′端（Zinovkin *et al.*，1999），可能参与蚜虫介导的传播（参见第 11 章第Ⅲ节 F）。

c. 胞间移动蛋白

ORF 3～ORF 7 分别编码 5 种参与 BYV 的细胞间移动的蛋白质：p6、HSP70h、p64、CPm 以及 CP（Alzhanova *et al.*，2000）。HSP70h 是热激蛋白（heat-shock protein）70 的同源物（homolog）（Agronovsky *et al.*，1991），利用免疫金标记对其定位，发现它与病毒粒体聚集相关而且接近（甚至位于）胞间连丝（Medina *et al.*，1999）。用绿色荧光蛋白标记和诱变该蛋白质，显示它是一种细胞间移动蛋白（Peremyslov *et al.*，1999）。HSP70h 与 BYV 病毒粒体以非离子（non-ionic）亦非共价的相互作用形成一种复合体（Napuli *et al.*，2000）；每个病毒粒体大约含有 20 个 HSP70h 分子。

d. 其他功能

对亚细胞组分（subcellular fraction）进行分析，在细胞质和细胞壁中可检测到 BYV 的 C 端的 p21（Zinovkin and Agranovsky，1998）。CTV 的 C 端 23 kDa 蛋白质是一个 RNA 结合蛋白（Lopez *et al.*，2000）。小分子蛋白质（BYV2、CTV3、LIYV 2/1）是疏水性的，据推测可能是一种膜结合蛋白（membrane-binding protein）。

e. ORF 的表达

ORF 1a 和 ORF 1b 由基因组 RNA 翻译表达，而其他 ORF 则是由一系列嵌套的

（nested set）亚基因组 RNA 表达（Hilf *et al.*，1995；He *et al.*，1997；Karasev *et al.*，1997）。

2. 毛形病毒属（*Crinivirus*）

毛形病毒属病毒（criniviruses）的基因组由两种独立包壳的 RNA 组成。莴苣侵染性黄化病毒（LIYV）的基因组已完成测序，并已确定 RNA 1 有 3 个 ORF，RNA 2 有 7 个 ORF（图 6.34）（图 6.5）。

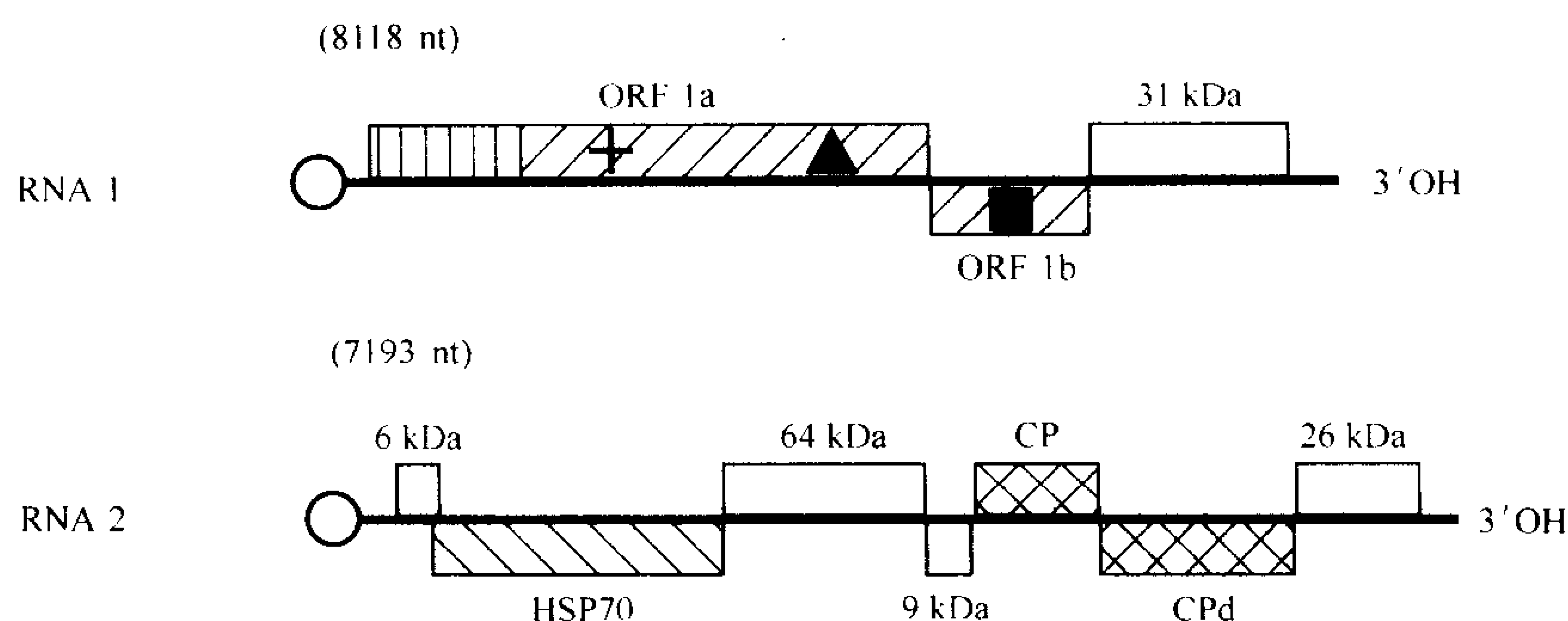


图 6.34　毛病毒属的典型成员莴苣侵染性黄化病毒（LIYV）。单线条代表正单链 RNA 基因组，5′端圆圈表示有帽子结构，+表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

RNA 1 的 5′端 ORF 含有的氨基酸模体预示其具有类木瓜蛋白酶（的蛋白酶）、甲基转移酶和解旋酶的活性。通过一个 +1 移码（参见第 7 章第Ⅴ节 B.10.b）将得到含 RdRp 模体的 ORF 1b。因此，与长线病毒属病毒（closteroviruses）一样，ORF 1a 和 ORF 1b 的产物将组成病毒的聚合酶。RNA 1 的 3′端 ORF 编码一个 31 kDa 蛋白质，它与 CTV 的 ORF 2 在大小和位置相近，但功能尚不清楚。

RNA 2 的 7 个 ORF 的组构与长线病毒的 3′端一半基因组类似，不同之处在于在外壳蛋白基因的上游多出一个 9 kDa ORF（ORF 2/4）主要和次要外壳蛋白 ORF 的顺序颠倒（ORF 2/5 与 ORF 2/6）以及外壳蛋白模块（coat protein module）下游的 ORF 的数量不同。同 BYV 一样，HSP70h 与病毒粒体相互作用（Tien *et al.*，1999）。

G. 黄症病毒科（*Luteoviridae*）（Mayo and Miller，1999；Smith and Barker，1999；Miller，1999）

黄症病毒科成员的基因组是 5.6～7 kb 的正单链 RNA，3′端无 poly（A）尾或类 tRNA 结构。根据基因组组构及病毒 5′ VPg 的有无而分属，马铃薯卷叶病毒属病毒（poleroviruses）和耳突花叶病毒属病毒（enamoviruses）的基因组有 5′ VPg 而黄症病毒属病毒（luteoviruses）没有。这三个属的代表性成员的基因组组构如图 6.35 所示。ORF 已经编号，标有同一号码的 ORF 被认为具有相似的功能。

ORF 1（约 70 kDa）和 ORF 2（约 48 kDa）的产物参与组成病毒的复制酶，ORF 2 由 ORF 1 的核糖体－1 移码表达（参见第 7 章第Ⅴ节 B.10.a）。ORF 2 含有 RdRp 模

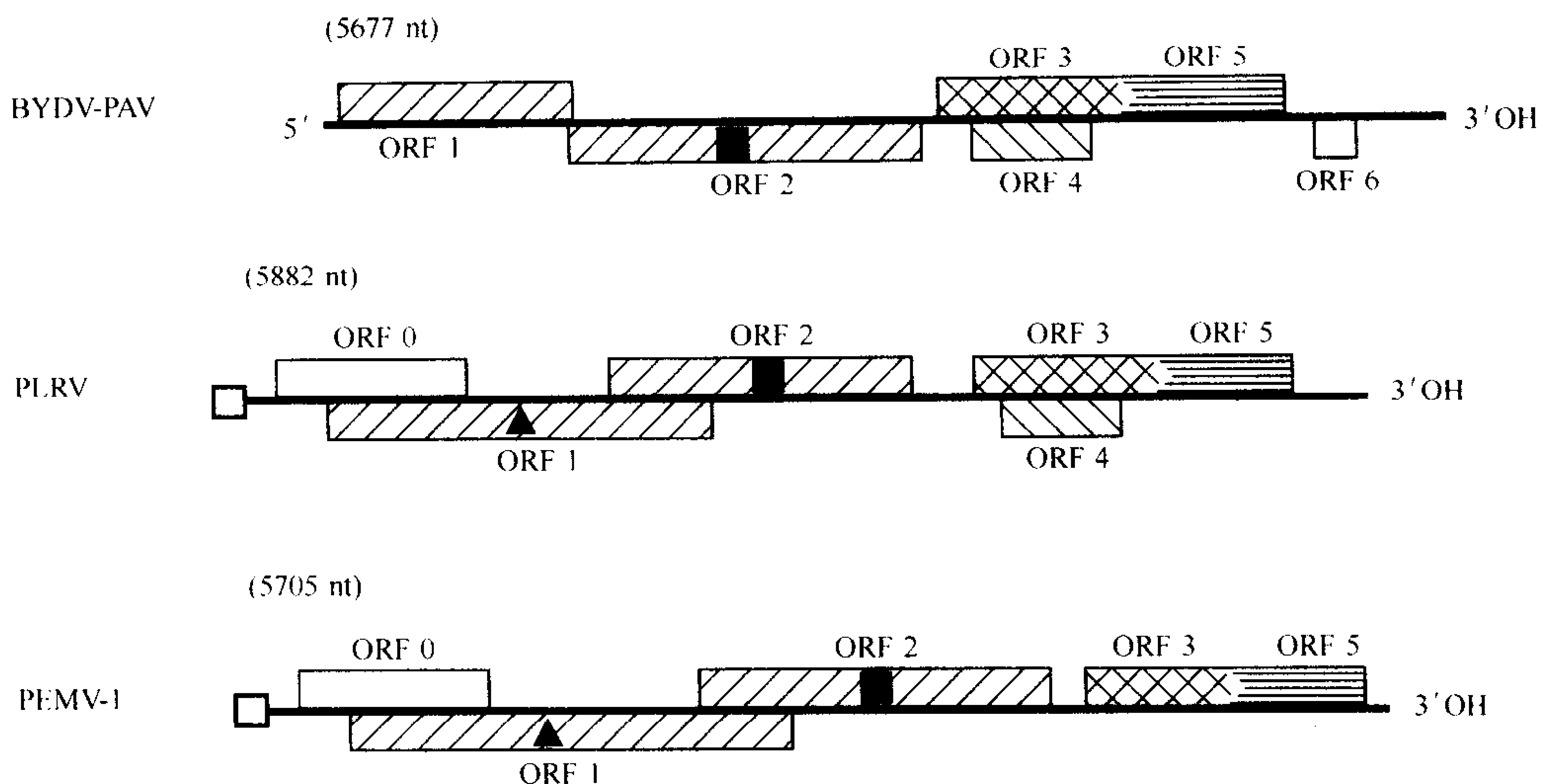


图 6.35　黄症病毒科（*Luteoviridae*）内各属的基因组组构。每单线条各代表正单链 RNA 基因组节段，5′端□表示有 VPg，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

体。马铃薯卷叶病毒属和耳突花叶病毒属的 ORF 1 含有一个类胰凝乳蛋白酶（chymotrypsin-like）（丝氨酸）蛋白酶的模体，ORF 1 产物的 C 端区域由 P1 自身或 P1 + P2 加工可得到 VPg（van der Wilk *et al.*，1997；Wobus *et al.*，1999）。在昆虫细胞内马铃薯卷叶病毒（PLRV）的 ORF 1 表达产物被切割生成一个大小约为 27 kDa 的 C 端片段（Li *et al.*，2000），推测是生成 VPg 的蛋白质。其排列顺序（蛋白酶：VPg：RdRp）与在小 RNA 样病毒（picorna-like viruses）中发现的排列顺序（VPg：蛋白酶：RdRp）不同（Domier *et al.*，1987）。

ORF 3 的产物是主要外壳蛋白。如第 7 章第Ⅴ节 E. 10 所述，该 ORF 的终止密码子通读后与 ORF 5 生成一个融合蛋白。就大多数病毒而言，ORF 3 + ORF 5 的融合蛋白产物在 ORF 5 产物序列的中间被切割。ORF 5 的产物可能参与蚜虫传毒，但是这方面的证据尚不明确。该产物与共生蛋白（symbionin）相互作用使病毒粒体在昆虫血腔内保持稳定（参见第 11 章第Ⅲ节 H. 1. a）。通读结构域看起来存在着明显的结构冗余（structural redundancy），造成功能分析上的困难（Brault *et al.*，2000）。

耳突花叶病毒属中未发现 ORF 4 。在其他两个属中，认为它参与病毒在植株中的移动，虽然也存在一些与此相悖的证据（conflicting evidence）。

ORF 0 编码一个 28～29 kDa 蛋白质，只存在于马铃薯卷叶病毒属和耳突花叶病毒属中，而 ORF 6（4～7 kDa）只存在于黄症病毒中。这些 ORF 的产物的功能尚不清楚。

如上所述，ORF 2 和 ORF 5 分别由其上游的 ORF 移码和通读而表达。ORF 1 和 ORF 2 由基因组 RNA 翻译得到，ORF 3、ORF 4 和 ORF 5 来自亚基因组 RNA 1，黄症病毒中 ORF 6 来自亚基因组 RNA 2。

H. 悬浮属（未归入科的病毒属）

1. 烟草花叶病毒属（*Tobamovirus*）（Lewandowski and Dawson，1999）

a. 基因组结构

TMV 是第一个完成基因组测序的植物 RNA 病毒（Goelet *et al.*，1982）。其后，烟草花叶病毒属的大多数病毒的正单链 RNA 基因组均完成测序（Van Regenmortel *et al.*，2000），图 6.36 所示是 TMV 的基因组组构。

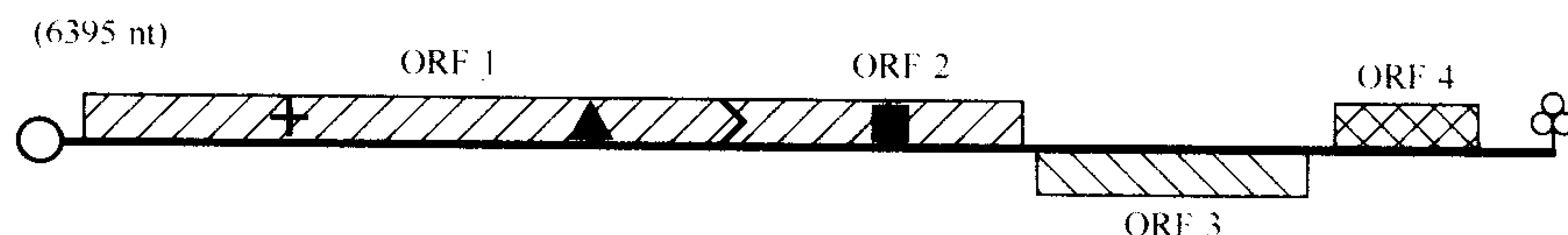


图 6.36 烟草花叶病毒属的典型种烟草花叶病毒（TMV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组节段，5′端圆圈表示有帽子结构，➤ 表示有终止密码子的通读，+ 表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

序列上紧凑分布着多个 ORF。一个 M^7Gppp 的帽子附在第一个核苷酸（鸟苷酸）上。接着是 69 个核苷酸的非编码序列（Ω 序列参见第 7 章第Ⅴ节 C.5）。它起始一个编码 126 kDa 蛋白质的 ORF。进一步的实验显示由于该蛋白质的终止密码子（UAG）是渗漏性的（leaky）而产生一个较大的 183 kDa 的通读蛋白。该通读蛋白的末端 5 个密码子与编码 30 kDa 蛋白质的第三个 ORF 重叠。ORF 3 终止于最靠近 3′端的第 4 个 ORF 的起始密码子前两个核苷酸的位置，ORF 4 编码 17.6 kDa 的外壳蛋白。如下一部分所述，基因组 3′端的两个较小的 ORF，是由已经被命名为 I_2 和 CP 的亚基因组翻译得到的。末端区域的 3′非翻译序列可以折叠成一个可接受组氨酸的类 tRNA 结构。其他已完成测序或部分测序的烟草花叶病毒属基因组的比较显示该属所有成员的基因组结构是相同的。

称为 I_1 的第三个亚基因组 RNA，代表了 3′端的一半基因组，已经从 TMV 侵染的组织中分离出来。SI 定位（SI mapping）显示该 RNA 的 5′端明确定位于基因组 3405 位核苷酸处（Sulzinski *et al.*，1985）。这些工作者提出了一个 I_1 RNA 的翻译模型。一个 90 bp 的非翻译区后紧跟着一个 AUG 密码子起始一个 54 kDa 蛋白质，终止于 4915 位核苷酸处。因此，54 kDa 蛋白质的氨基酸序列与 183 kDa 蛋白质的 C 端核苷酸残基是相同的。在第 7 章（第Ⅴ节 E.1）中将详细介绍该 54 kDa 蛋白质。

b. 体外合成的蛋白质

TMV 基因组 RNA 可以在多个无细胞系统中得到翻译。在网织红细胞裂解物系统（reticulocyte lysates system）（Knowland *et al.*，1975）和小麦胚系统（wheat germ system）（Bruening *et al.*，1976）中可以生成两个较大的多肽，但是这些以及后来的工作者都未发现外壳蛋白。TMV 的基因组并不足以独立编码这两个较大的蛋白质。利用网织红细胞裂解物系统，Pelham（1978）发现这两个蛋白质的合成是从同一位点起始的。较大的那个蛋白质是由一个终止密码子被部分通读产生的。这两个蛋白质有相同的

读框，所以小蛋白质的氨基酸序列包含在较大的蛋白质内，这一结论可以通过上一节讲述的核苷酸序列得到充分证实。在体外低温条件下，大分子蛋白质的产量会增加（Kurkinen，1981）。大分子蛋白质的产量因提取物中出现的 $tRNA^{tyr}$ 种类而异（Beier *et al.*，1984a，b）。

从受侵染的组织中分离得到的 I_1 亚基因组 RNA 在兔网织红细胞系统中可体外翻译生成 54 kDa 多肽（Sulzinski *et al.*，1985）。

编码 30 kDa 和 17.6 kDa 蛋白质的两个 I_2 基因不是从基因组 RNA，而是从两个亚基因组 RNA 翻译出来的。许多工作者在体外系统中研究了从受侵染组织中分离得到的 I_2RNA。它翻译生成一个 30 kDa 蛋白质。它的 5′端没有帽子结构（Joshi *et al.*，1983），看来是以 5′二磷酸和三磷酸（di- and triphosphates）的形式终止（Hunter *et al.*，1983）。转录起始位点已经定位于 3′端的 1558 位核苷酸处（Watanabe *et al.*，1984a）。I_2RNA 也含有一个较小的 3′端基因（图 7.26），但它在体外系统中不翻译。

TMV 最小的基因（3′端外壳蛋白基因）在体外只能由单顺反子的亚基因组 RNA（monocistronic subgenomic RNA）翻译表达（图 7.26）（Knowland *et al.*，1975；Beachy and Zaitlin，1977）。该基因在体外也可通过大肠杆菌（*Escherichia coli*）的原核蛋白质合成机制（prokaryotic protein-synthesizing machinery）得到有效的翻译（Glover and Wilson，1982）。

c. 体内合成的蛋白质

在受侵染的叶片（Scalla *et al.*，1976）和原生质体（Sakai and Takebe，1974）中已发现了在分子质量上大致对应于 183 kDa 和 126 kDa 的蛋白质。对从受侵染的叶片中得到的一个 110 kDa 蛋白质的溴化氰肽分析（cyanogen bromide peptide analysis）显示它与相近大小的体外翻译产物是相同的（Scalla *et al.*，1978）。在受侵染的烟草原生质体（Beier *et al.*，1980）和叶片（Joshi *et al.*，1983）中均可检测到 30 kDa 蛋白质。

Kiberstis 等（1983）和 Ooshika 等（1984）针对利用 30 kDa 蛋白质 C 端 11 个或 16 个氨基酸的预测序列而合成的寡肽制备了抗体。TMV 侵染的原生质体中的 30 kDa 蛋白质可以被这些抗体沉淀，这样我们可以肯定它是 I_2 基因的产物。

许多工作者已证明 TMV 外壳蛋白的体内合成。由于氨基酸全序列已经清楚，TMV 基因组 3′区域核苷酸序列的确定使我们定位了编码该蛋白质的基因（Tsugita *et al.*，1960；Anderer *et al.*，1960）。预先经过碱处理的病毒在体外启动蛋白质的合成情况将在第 7 章（第Ⅱ节 A.4）中讲述。

至今还没有在体内检测到与 I_1 亚基因组 RNA 的 54 kDa 体外翻译产物相对应的蛋白质。因此，TMV 基因组共编码 4 个基因产物。

d. 病毒编码蛋白的功能

i. 外壳蛋白

外壳蛋白的主要功能是很明确的。但是，一些研究显示它是多功能的。例如，包含 *N′* 基因的烟草种类（*Nicotiana* species）对 TMV 的普通株系的反应是系统的花叶病，而番茄花叶病毒则引起局部坏死损害而没有花叶症状。Saito 等（1987a）通过构建两个病毒株系之间的重组体，表明引发坏死反应的病毒因子位于外壳蛋白基因上。通过将野生型 TMV 和用亚硝酸处理得到的突变体进行重组，Knorr 和 Dawson（1988）确定，

基因组中位于外壳蛋白基因的第 6157 位核苷酸的单一位点突变，导致了外壳蛋白中第 148 位的丝氨酸被苯丙氨酸取代，是引起局部坏死斑反应的原因（进一步的介绍参见第 10 章第Ⅲ节 E）。其他一些关于外壳蛋白基因被部分或全部缺失突变的研究显示，外壳蛋白也能以其他方式影响症状（W. O. Dawson *et al.*，1988）。外壳蛋白在病毒移动中也发挥一定的作用，因为突变体建立系统侵染并没有野生型病毒那样有效（参见第 9 章第Ⅱ节 D. 5. a）。

ii. 126 kDa 和 183 kDa 蛋白质

这两个蛋白质都参与了病毒 RNA 的复制。它们含有一段和已知的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（复制酶）同源的重要氨基酸序列（Kamer and Argos，1984）。126 kDa 基因的突变将引起 30 kDa 蛋白质及其 mRNA 合成的减少，显示 126 kDa 或者 183 kDa 或者两者都与 I_2RNA 的合成有关（Watanabe *et al.*，1987b）。最令人信服的证据是 Meshi 等（1987）构建的缺失 30 kDa 和外壳蛋白基因的突变体，侵染原生质体后产生了一个缩短的病毒 RNA。

在体外，发生在 126 kDa 基因的终止密码子或其附近的诱变结果显示，这两个蛋白质对于烟草叶片上正常的 TMV 复制都是必需的（Ishikawa *et al.*，1986）。

对于 TMV 复制复合体中包含这两种蛋白质的了解将在第 8 章（第Ⅳ节 H）中讲述。

iii. 30 kDa 蛋白质

对温度敏感突变体（*ts* mutant）的遗传学研究第一次证明了病毒所编码的某种功能的存在是 TMV 在细胞间移动所必需的（Taliansky *et al.*，1982b；Atabekov *et al.*，1983）。对与细胞间移动相关的 TMV 温度敏感突变体（LsI）编码的 4 个蛋白质的研究显示其中只有 30 kDa 蛋白质与正常病毒不同（Leonard and Zaitlin，1982）。该突变体中导致温度敏感状态的突变已证实是由于该 30 kDa 蛋白质上的一个丝氨酸变为脯氨酸（Ohno *et al.*，1983b）。此后，对于 30 kDa 蛋白质参与 TMV 细胞间移动做了细致的研究；这些将在第 9 章（第Ⅱ节 D. 5. a）中讲解。

2. 烟草脆裂病毒属（*Tobravirus*）（Visser *et al.*，1999）

烟草脆裂病毒的基因组为双组分正单链 RNA（图 6. 37）。

a. 基因组结构

i. RNA 1

烟草脆裂病毒（TRV）（SYM 株系）的 RNA 1 是第一个得到全序列测定的烟草脆裂病毒属病毒（tobraviruses）（Boccara *et al.*，1986；Hamilton *et al.*，1987）。该 RNA 长 6791 个核苷酸，而且所有的烟草脆裂病毒属病毒的 RNA 1 的长度大致都是如此。4 个 ORF 的排列如图 6. 37 所示。ORF 1（194 kDa）和 ORF 2（29 kDa）并列（juxtapose）于同一个读框内。ORF 3 和 ORF 4，也称作 P1a 和 P1b，分别编码 29 kDa 和12 kDa蛋白质。3′端有一个 255 nt 的非编码区域。虽然 TRV RNA 1 不能被氨酰化，但是 3′端区域有一个类 tRNA 结构（van Belkum *et al.*，1987）。

豌豆早枯病毒（PEBV）RNA 1 的序列（MacFarlane *et al.*，1989）显示其有着与 TRV 相似的基因排列。但是，ORF 4 编码的蛋白质稍微有点小（12 kDa）。大小的不

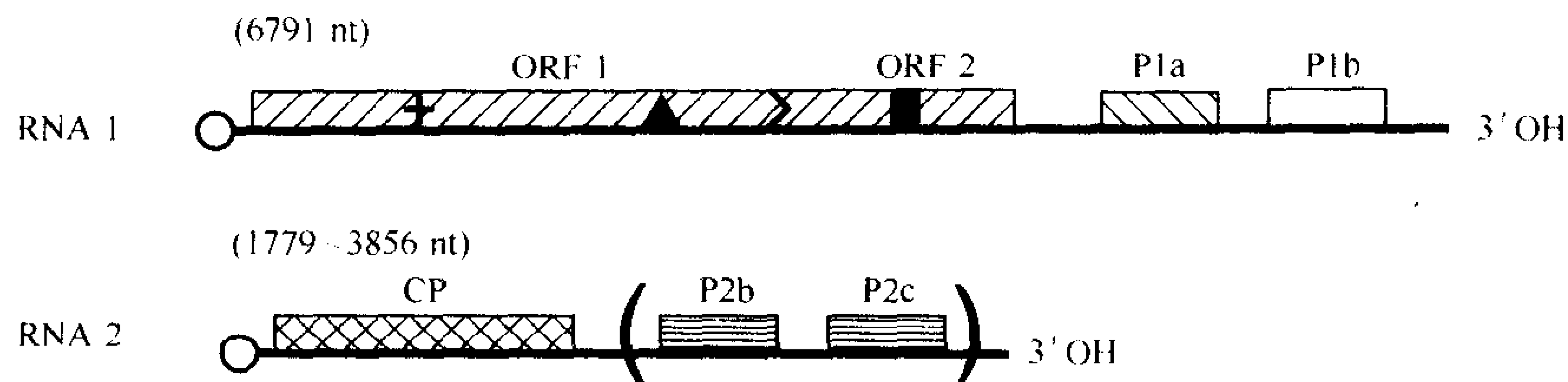


图 6.37 烟草脆裂病毒属的典型种烟草脆裂病毒（TRV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组节段，5′端圆圈表示有帽子结构，❯表示有终止密码子的通读，+ 表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。括号（）表示 RNA 2 上的 ORF 因病毒株系的不同而异（图 6.38）

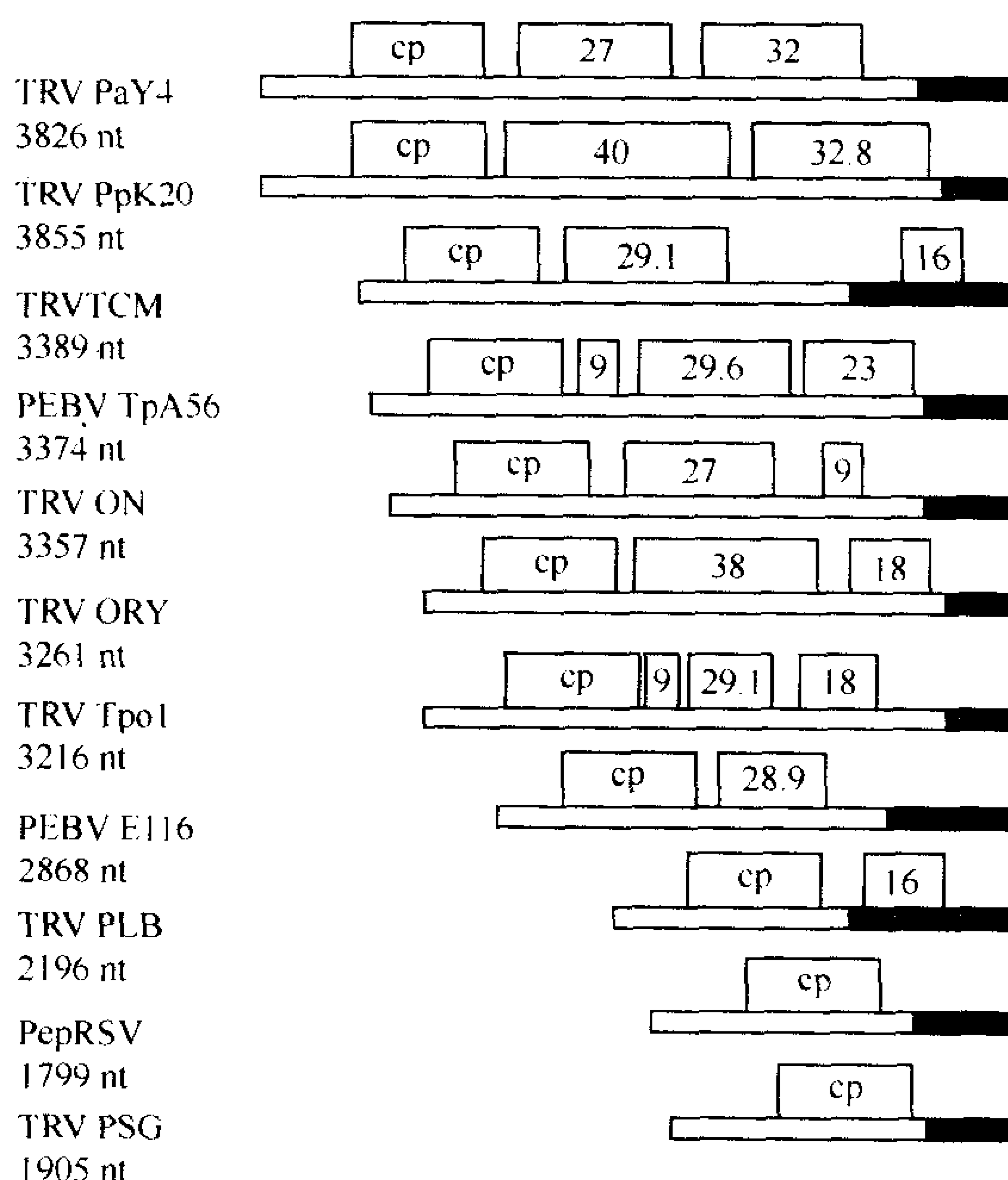


图 6.38 烟草脆裂病毒属的病毒分离物 RNA 2 的基因组组构及长度。编码衣壳蛋白（CP）与非结构蛋白的可读框由长方形框表示：框内数字表示编码蛋白的分子质量（kDa）。在 RNA 2 的 3′端涂黑的部分表示与 RNA 1 的相应部分同源的核苷酸序列。承蒙许可，根据 Visser（2000）的原图修改。

同是由于 PEBV 的蛋白质与 TRV 相比缺少一个 35 个氨基酸的连续序列。两个蛋白质都有一个含有半胱氨酸和组氨酸残基的重复的模体（duplicated motif）。因此，烟草脆裂病毒属的该基因产物可能是一个“锌指”（zinc finger）蛋白，具有依赖于锌的核酸结合（zinc-dependent nucleic acid binding）能力。

ii. RNA 2

烟草脆裂病毒属病毒（tobraviruses）的 RNA 2 长度差异比较大，为 1800～4000 nt。TRV 的不同株系在 RNA 2 序列上显示丰富的多样性。RNA 2 长度的多变在于有

无较大分子的其他基因出现，及其与相应 RNA 1 同源但大小可变的 3′端区域。

在 RNA 2 中共有的 ORF 只有一个，它被定位于 5′端，编码外壳蛋白（22～24 kDa）。其下游的 RNA 2 序列因病毒和株系而异（图 6.38）。在一些株系中，如 TCM 和 PLB，与 RNA 1 同源的 3′ 端 RNA 包含一个可编码 16 kDa 蛋白质的 ORF。

b. 编码的蛋白质

i. RNA 1

SYM 株系的 RNA 1 编码一个 134 kDa 蛋白质，其乳白（opal）终止密码子（UGA）可被通读产生一个 194 kDa 的蛋白质。194 kDa 蛋白质与 TMV、AMV、BMV 和 CMV 中推定的复制酶显示出序列的相似性（Hamilton *et al.*，1987）。与 TMV 的序列的相似性尤其明显。29 kDa 蛋白质显现出与 TMV 30 kDa 相似的一些序列，因此，它与病毒的细胞间移动有关。16 kDa ORF 和其他病毒蛋白之间没有发现相似处。该蛋白质不是复制所必需的，但是该 ORF 突变后的 PEBV RNA 1 侵染性转录物形成的病毒的种子传播率小于野生型病毒的 1%。

RNA 1 在兔网织红细胞系统中翻译产生 170 kDa 和 120 kDa 两个多聚蛋白（Pelham，1979）。在添加亚精胺（spermidine）的小麦胚系统中也可以生成这两个多聚蛋白，伴随许多更小的产物（Fritsch *et al.*，1977）。如图 6.37 所示，这两个蛋白质对应于 194 kDa 和 134 kDa ORF（ORF 1 和 ORF 2）。对 PEBV 的研究也已报道过类似的结果（Hughes *et al.*，1986）。29 kDa ORF 的蛋白产物是由一个亚基因组 RNA（1A）翻译的（Robinson *et al.*，1983）。16 kDa 蛋白质也是由一个亚基因组 RNA（1B）翻译的（Guilford，1989）。受侵染的原生质体中发现一种 16 kDa 蛋白质产物（Angenent *et al.*，1989a），它被结合进一个高分子质量的细胞组分中。

ii. RNA 2

PRN 株系的 RNA 2 在体外翻译生成外壳蛋白，这已通过血清学、肽作图（peptide mapping）以及与真正的外壳蛋白一起特异性地聚合生成盘式聚合体（disk aggregate）得以证实（Fritsch *et al.*，1977）。体外翻译还得到一种不相关的 31 kDa 大小的蛋白质，RNA 2 制备物的体外翻译产物因株系和病毒的不同而异，很可能是由于该基因组节段受到了亚基因组 RNA（sgRNA）不同程度的污染。

TRV 的 PSG 株系，其 RNA 2 没有附加的 ORF 却具有侵染性，表明其他株系的 RNA 2 的附加基因与复制无关。可是，该株系，以及确实含有附加 ORF 的 PLB 和 TCM 株系，都不能被任何已知的线虫载体所传播。TPA56 和 PpK20 株系 RNA 2 的非结构基因区突变可以完全破坏其线虫传播性（nematode transmissibility）。因此，RNA 2 的一些非结构基因参与了线虫传播，我们将在第 11 章第Ⅸ节 E 中对该主题做更充分的讨论。

3. 马铃薯 X 病毒属（*Potexvirus*）（AbouHaidar and Gellatly，1999）

基因组结构和策略

马铃薯 X 病毒属病毒（potexviruses）的基因组是单组分正单链 RNA，分子质量为 5.9～7.0 kb。5′端有一个 M7Gppp 帽子，3′端为 poly（A）尾。该属少数几个成员的基因组已完成测序，而且大多数含有 5 个 ORF，其基因排列和编码容量如图 6.39 所示。

一些病毒种，如木薯普通花叶病毒（CsCMV）、水仙花叶病毒（NMV）、草莓轻型黄边病毒（SMYEV）和白三叶草花叶病毒（WClMV）等都含有完全位于ORF 5内部的第6个小ORF，尽管它没有已知的蛋白质产物且功能不清楚。

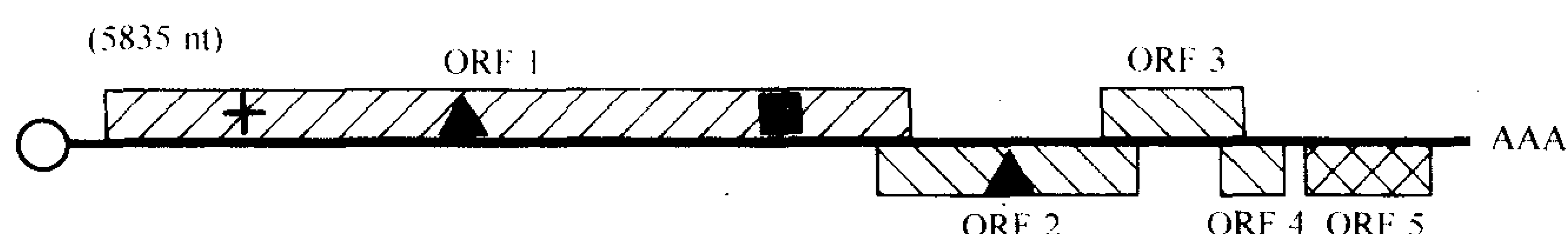


图6.39 马铃薯X病毒属的典型种马铃薯X病毒（PVX）的基因组组构。单线条代表正单链RNA基因组，5′端圆圈表示有帽子结构，3′端的AAA表示poly(A)尾，+表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，■表示RdRp模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各ORF编码产物的功能。具体说明请见图6.1。

大多数马铃薯X病毒属病毒（potexviruses）的5′端有40 nt显示出很高的同源性，而且5′端非编码区富含A和C碱基。ORF 1（147 kDa）于5′端108位核苷酸处开始，它所编码的蛋白质含有与其他RNA病毒中预测的聚合酶基因序列相似的结构域。它对应于基因组RNA体外翻译得到的一个160 kDa蛋白质（Forster *et al.*，1987）。ORF 2（25 kDa）、ORF 3（12 kDa）和ORF 4（8 kDa）略微重叠，而且一般称为三基因块（triple gene block）。这些ORF的产物参与细胞间移动而且将在第9章第Ⅱ节D. 2. f和D. 5. c中讲述。一些马铃薯X病毒属病毒的ORF 2～ORF 4的组构显然是例外。例如，SMYEV的ORF 2缺少一个常规的起始密码子（AUU；Jelkmann *et al.*，1992），百合X病毒（LVX）的ORF 4也是如此。ORF 5编码病毒粒体的外壳蛋白，大小为18～27 kDa，因病毒种类而异。外壳蛋白亚基可能会在病毒保存和纯化过程中受到蛋白酶解切割。

ORF 1由基因组RNA翻译，ORF 2、ORF 3和ORF 4来自sgRNA 1（1.9～2.1 kb），外壳蛋白来自sgRNA 2（0.9～1.0 kb）。

4. 香石竹潜隐病毒属（*Carlavirus*）（Zavriev，1999）

大多数香石竹潜隐病毒的病毒粒体包含7.4～7.7 kb的单组分正单链RNA；蓝莓（乌饭树）焦枯病毒（BlScV）和马铃薯M病毒（PVM）的基因组稍大，约8.5 kb。RNA 3′端有poly（A）尾，5′端可能有帽子结构。它含有6个ORF（图6.40）。

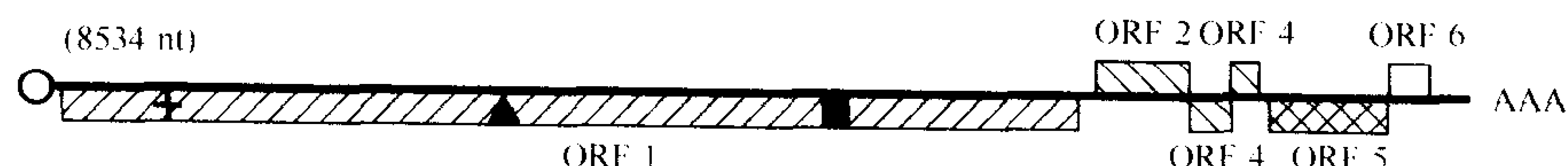


图6.40 香石竹潜隐病毒属的马铃薯M病毒（PVM）的基因组组构。单线条代表正单链RNA基因组，5′端圆圈表示帽子结构，3′端的AAA表示poly(A)尾序，+表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，■表示RdRp模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各ORF编码产物的功能。具体说明请见图6.1。

ORF 1位于75 nt的非编码前导序列后面，编码一个223 kDa的多肽，为病毒的复

制酶。ORF 2（25 kDa）、ORF 3（12 kDa）和ORF 4（7 kDa）形成一个三基因块，参与细胞间的移动，与前面所述的马铃薯X病毒属病毒相似。ORF 5 编码 34 kDa 外壳蛋白，与之重叠的 ORF 6 编码一个 11～16 kDa 富含半胱氨酸、功能未知的蛋白质。

ORF 1 由基因组 RNA 翻译。在一些病毒种类中会发现两个可能被包壳的、大小为 2.1～3.3 kb 以及 1.3～1.6 kb 的亚基因组 RNA。

5. 葱X病毒属（*Allexivirus*）

火葱X病毒（ShVX）的正单链 RNA 编码 6 个 ORF（图 6.41）（Kanyuku *et al.*，1992）。3′端具有 poly（A）尾，5′端的结构尚不清楚。ORF 1，位于 98 nt 的 5′非编码区后面，编码一个 195 kDa 的多肽，它含有病毒聚合酶特有的甲基转移酶、解旋酶和 RdRp 模体。ORF 2（26 kDa）和 ORF 3（11 kDa）类似于上述马铃薯X病毒属病毒和香石竹潜隐病毒属病毒（carlaviruses）的三基因块中的前两个 ORF。此外还存在着一个三基因块中第三个较小元件的编码序列（7～8 kDa），但是没有 AUG 起始密码子。ORF 4 的 42 kDa 产物在受侵染的植株中大量表达，但其功能不清楚。ORF 5 编码 28 kDa 的外壳蛋白。由于其高度疏水性（high hydrophobicity），该蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶电泳时的迁移率像一个 32～36 kDa 的分子。3′端的 ORF 6 编码的 15 kDa 蛋白质的作用还不明确；像香石竹潜隐病毒 3′ ORF 编码的蛋白质一样，该蛋白质有一个锌指模体（zinc-binding finger motif），因此可与核酸结合。

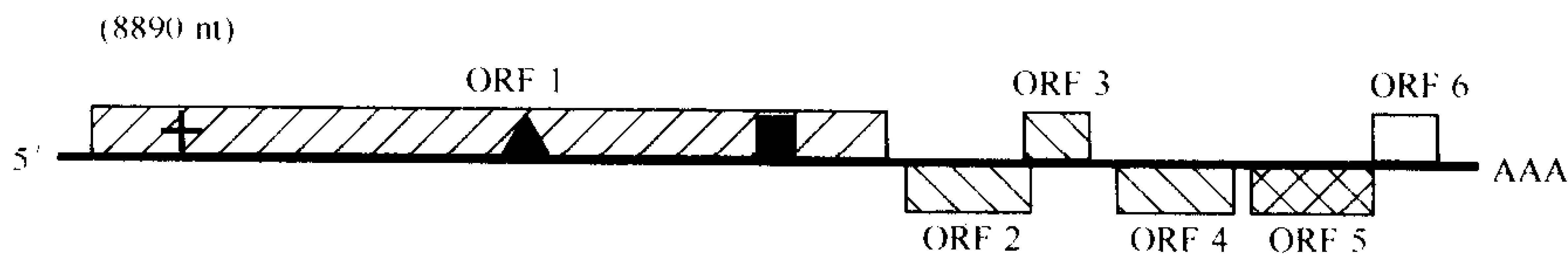


图 6.41　葱X病毒属的典型种火葱X病毒（ShVX）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组，5′端圆圈表示有帽子结构，3′端的 AAA 表示 poly(A)尾，+ 表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

6. 发样病毒属（*Capillovirus*）

苹果茎沟病毒（ASGV）的基因组 RNA 3′端具 poly（A）尾，5′端的结构尚不确定（Yoshikawa *et al.*，1992）。有 2 个 ORF（图 6.42）：ORF 1 编码一个推定的 240～266 kDa蛋白质，其 5′端的模体表明该蛋白质可能是一个聚合酶。外壳蛋白的顺反子（coat protein cistron）位于该 ORF 的 3′端。尽管看起来该大蛋白质是一个多聚蛋白，但是存在一个 1.0 kb 的亚基因组 RNA 可能是其 mRNA。ORF 2（36～52 kDa）的产物大小随病毒种类而变化。该蛋白质很可能由一个 2.0 kb 的亚基因组 RNA 表达，其功能是参与细胞间的移动。

7. 凹陷病毒属（*Foveavirus*）

凹陷病毒属病毒（foveaviruses）的基因组 3′端有 poly（A）尾，暂定成员樱桃绿

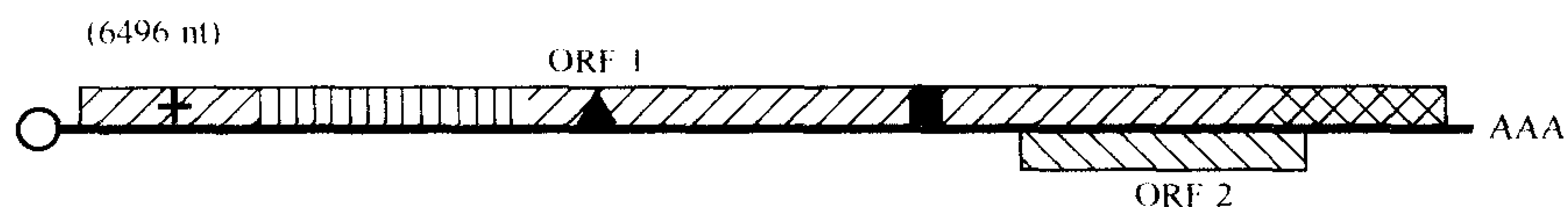


图 6.42　线形病毒属的典型种苹果茎沟病毒（ASGV）的基因组结构。单线条代表正单链 RNA 基因组，5′端圆圈表示有帽子结构，3′端的 AAA 表示 poly(A)尾，+ 表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

环斑驳病毒（CGRMV）的基因组 5′端有帽子结构。该属的典型种苹果茎痘病毒(ASPV)编码 5 个 ORF（图 6.43）(Jelkmann，1994；Martelli and Jelkmann，1998)。ORF 1 编码一个 247 kDa 蛋白质，其甲基转移酶、解旋酶和 RdRp 模体表明它应该是一个聚合酶。ORF 2（25 kDa）、ORF 3（13 kDa）和 ORF 4（7 kDa）组成一个三基因块，其产物据认为可参与细胞间的移动（参见第 9 章第Ⅱ节 D.2.f）。ORF 5 编码 44 kDa 的外壳蛋白。CGRMV 另外有两个额外的 ORF：2a（14 kDa）和 4a（18 kDa），分别嵌套于 ORF 2 和 ORF 5 中，其功能尚不清楚。

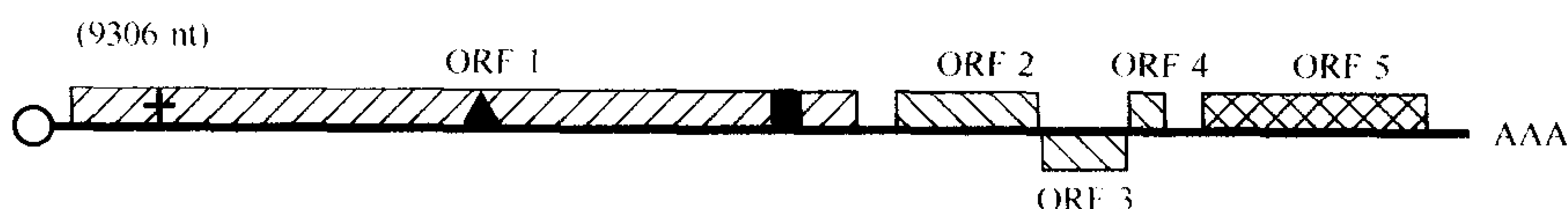


图 6.43　凹陷病毒属（*Foveavirus*）的典型种苹果茎痘病毒（ASPV）的基因组结构。单线条代表正单链 RNA 基因组，5′端圆圈表示有帽子结构，3′端的 AAA 表示 poly(A)尾，+ 表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

ORF 1 由基因组 RNA 直接翻译表达。几个亚基因组 RNA 据认为表达其他几个 ORF。

8. 纤毛病毒属（*Trichovirus*）(German-Retana and Candresse，1999)

纤毛病毒属病毒的基因组 RNA 5′端有帽子结构，3′端有 poly（A）尾。它有 3 个 ORF（图 6.44）。ORF 1 编码一个 216 kDa 蛋白质，具有聚合酶特有的甲基转移酶、解旋酶和 RdRp 的模体。它还包括一个类似木瓜蛋白酶的蛋白酶结构域。ORF 2 的产物（50 kDa）与 CaMV 的基因 1 以及 TMV 30 kDa 蛋白质有着远缘的相似性，因此据认为与细胞间移动相关。它在受侵染的昆诺藜（*Chenopodium quinoa*）的细胞壁和细胞膜制备物中已被检测到，而且在体内会被磷酸化。ORF 3 编码 22～28 kDa 的外壳蛋白。

ORF 1 由基因组 RNA 翻译，ORF 2 和 ORF 3 分别通过 2.2 kb 和 1.1 kb 的亚基因组 RNA 翻译表达。

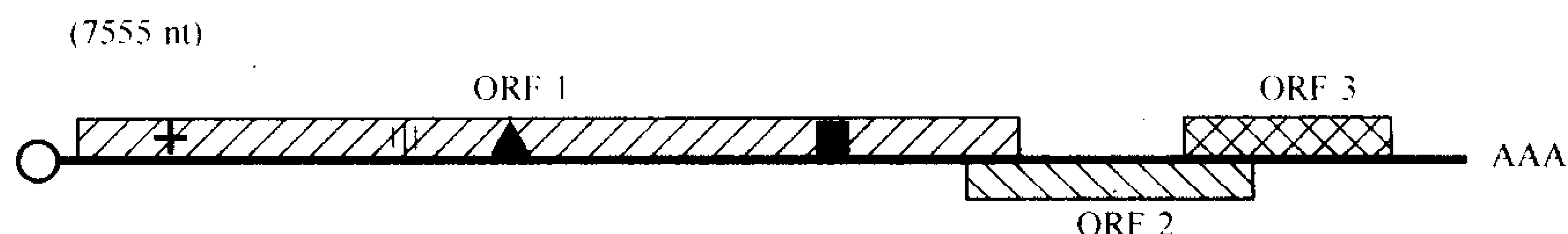


图 6.44　发样病毒属的典型种苹果褪绿叶斑病毒（ACLSV）的基因组组构。单线条代表正单链RNA基因组，5′端圆圈表示有帽子结构，3′端的AAA表示poly(A)尾，+表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，（‖）表示蛋白酶模体，■表示RdRp模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各ORF编码产物的功能。具体说明请见图6.1。

9. 葡萄病毒属（*Vitivirus*）（German-Retana and Candresse，1999）

现今被划分在葡萄病毒属的6个种最初都在发样病毒属中，但它们在基因组组构上明显不同于后者。与发样病毒属病毒（trichoviruses）相似的是，葡萄病毒属病毒（vitiviruses）的基因组RNA的5′端有帽子结构，3′端是poly（A）尾。可是，与发样病毒属病毒的不同之处在于，葡萄病毒属病毒有5个ORF（图6.45）。ORF 1（194 kDa）是病毒的聚合酶，含有甲基转移酶、解旋酶和聚合酶模体；看来它并不含有发样病毒属病毒所具有的类似木瓜蛋白酶的蛋白酶。ORF 3（31 kDa）编码细胞间移动蛋白，ORF 4编码21.5 kDa的外壳蛋白。另外两个ORF［ORF 2（19 kDa）和3′端的ORF 5（10 kDa）］在发样病毒属病毒中不存在，其功能尚不清楚。

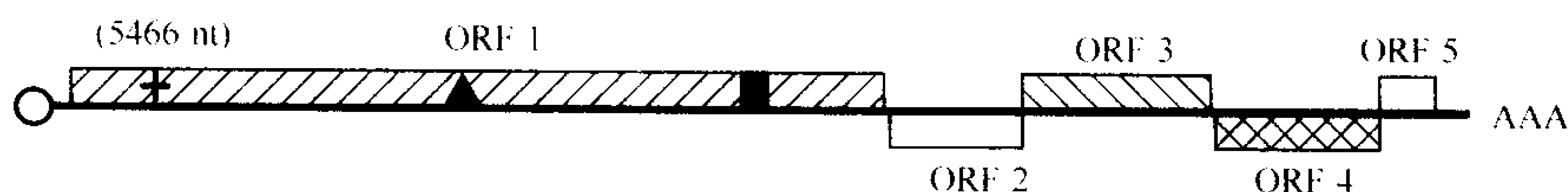


图 6.45　葡萄病毒属的典型种葡萄A病毒（GVA）的基因组组构。单线条代表正单链RNA基因组，5′端圆圈表示有帽子结构，3′端的AAA表示poly(A)尾，+表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，■表示RdRp模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各ORF编码产物的功能。具体说明请见图6.1。

葡萄A病毒（GVA）和葡萄D病毒（GVD）侵染的植物中出现的4条主要的病毒特异性的双链RNA条带，可能是通过非5′端ORF的亚基因组RNA策略表达的，但是详细情况还不清楚。

10. 真菌传杆状病毒属（*Furovirus*）（Shirako and Wilson，1999）

真菌传杆状病毒属的典型成员土传小麦花叶病毒（SBWMV）的基因组分成两条RNA（图6.46）（Shirako and Wilson，1993）。两个RNA分子都有5′端帽子，3′端都可折叠成一个可接受缬氨酸的类tRNA结构。RNA 1包括两个ORF。ORF 1a的5′端部分编码一个150 kDa、含有甲基转移酶和解旋酶模体的蛋白质；ORF 1a末端的渗漏性UGA终止密码子的通读生成一个由ORF 1aRT编码的209 kDa蛋白质。通读的部分含有一个RdRp模体。因此，ORF 1a编码病毒的聚合酶。ORF 1b的产物是37 kDa蛋白质，预测为细胞间移动蛋白，据认为是由亚基因组RNA表达的。RNA 2也包括两个

ORF。ORF 2a 从 AUG 起始密码子开始编码 19 kDa 外壳蛋白，从其上游的 CUG 密码子开始编码一个 25 kDa 蛋白质（参见第 7 章第Ⅴ节 B. 6）。19 kDa 蛋白质 UGA 终止密码子通读得到一个 84 kDa 蛋白质。该蛋白质的通读部分可能和病毒与其真菌介体之间的相互作用有关。ORF 2a 产物是一个富含半胱氨酸的 19 kDa 蛋白质，据认为由亚基因组 RNA 表达；该蛋白质的功能尚未确定。

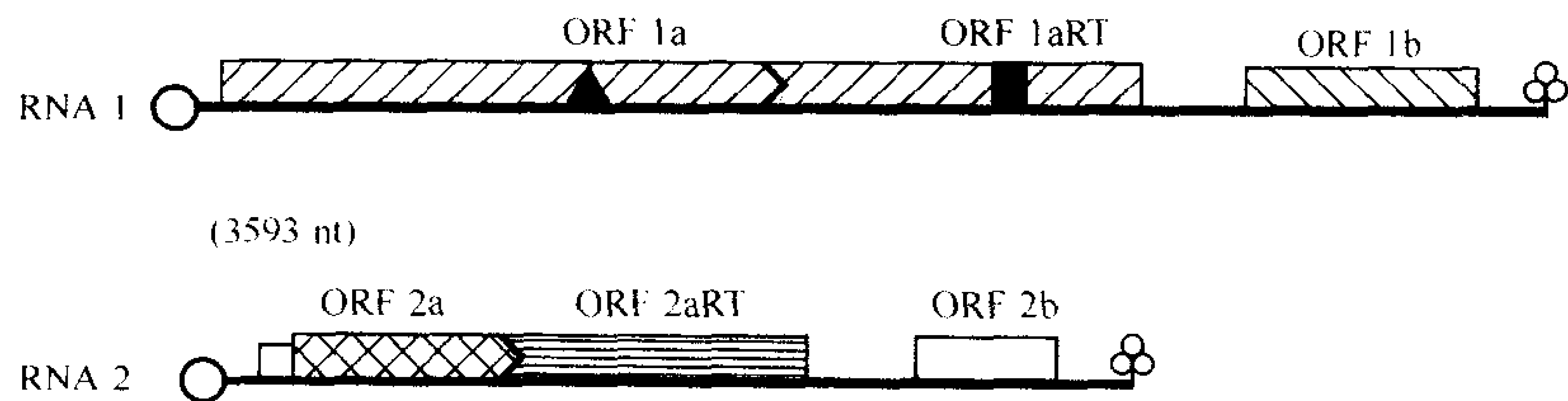


图 6.46　真菌传杆状病毒属的典型种土传小麦花叶病毒（SBWMV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组，5′端圆圈表示有帽子，3′端的三叶草结构表示类 tRNA 结构，▲表示解旋酶模体，❯表示有终止密码子的通读，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

11. 花生丛簇病毒属（*Pecluvirus*）（Reddy *et al.*，1999；Shirako and Wilson，1999）

花生丛簇病毒（PCV）的二分体基因组 RNA 在其 5′端有帽子结构，其 3′端可折叠成一个可接受缬氨酸的类 tRNA 结构（图 6.47）（Manohar *et al.*，1993；Hertzog *et al.*，1994）。RNA 1 包括两个 ORF。ORF 1a 编码一个 131 kDa 蛋白质，其 N 端区域含有一个甲基转移加帽酶的模体，C 端区域含有一个解旋酶模体。一个 UGA 终止密码子的通读得到一个 191 kDa 蛋白质，其通读部分包含一个 RdRp 模体。因此，同真菌传杆状病毒属病毒（furoviruses）一样，ORF 1 产物是复制酶复合体的病毒组分（viral moiety）。ORF 1b 编码一个 15 kDa、富含半胱氨酸、功能未知的蛋白质，据认为是由一个亚基因组 RNA 表达的。PCV RNA 2 含有 5 个 ORF。390 nt 的 5′非翻译区后接着

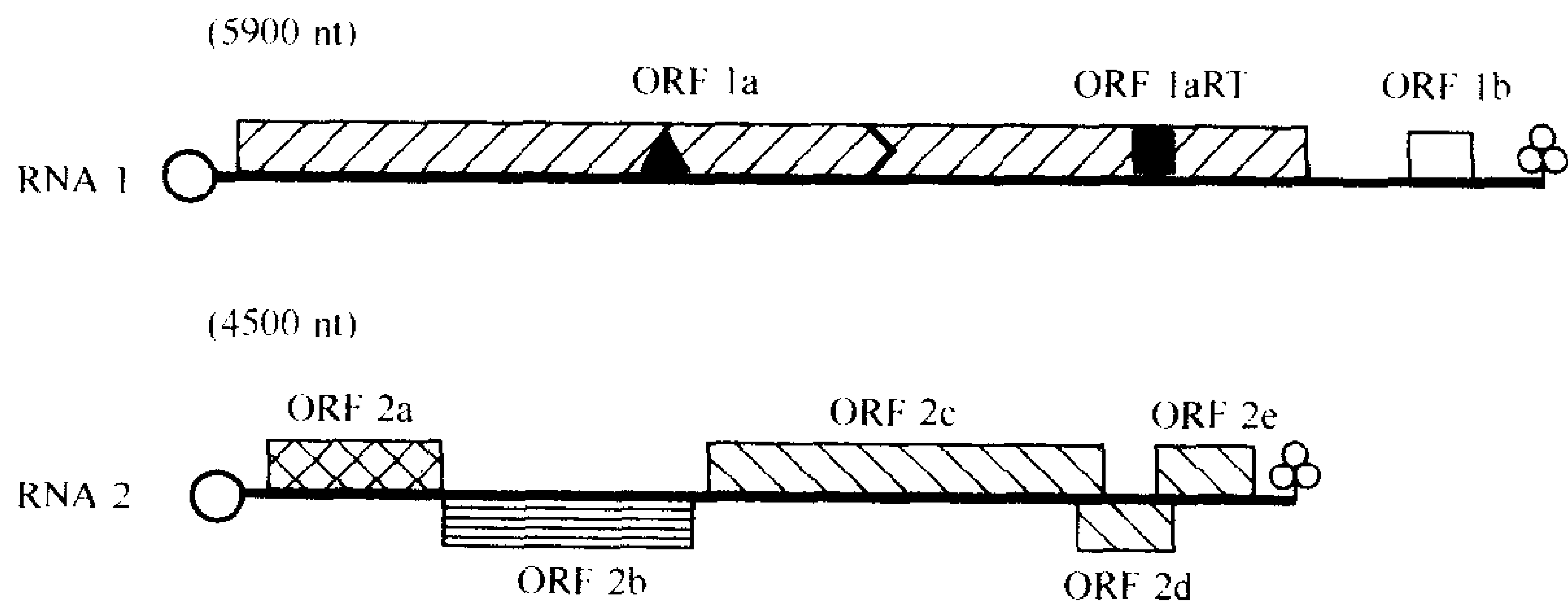


图 6.47　花生丛簇病毒属的典型种花生丛簇病毒（PCV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组，5′端圆圈表示有帽子，3′端的三叶草结构表示类 tRNA 结构，▲表示解旋酶模体，❯表示有终止密码子的通读，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

是 23 kDa 外壳蛋白的 ORF 2a。ORF 2b 与 ORF 2a 有两个核苷酸的重叠，通过渗漏扫描（leaky scanning）表达 39 kDa 蛋白质，该蛋白质可能参与病毒的真菌传播。其他 3 个 ORF 组成一个分别编码 51kDa、14 kDa 和 17 kDa 蛋白质的三基因块，增强病毒在细胞与细胞之间的移动。ORF 2～ORF 5 的产物可能是由亚基因组 RNA 表达的，但其细节尚不清楚。

12. 马铃薯帚顶病毒属（*Pomovirus*）(Torrance, 1999; Shirako and Wilson, 1999)

马铃薯帚顶病毒属成员的基因组为三组分正单链 RNA。图 6.48 所示为甜菜土传病毒（BSBV）的基因组组构（Koenig *et al.*, 1996; 1997; Koenig and Loss, 1997）。每个 RNA 分子的 5′端都加帽，3′端形成一个含有缬氨酸反密码子（anticodon for valine）的类 tRNA 结构。RNA 1 含有单一的 ORF，编码一个 149 kDa 蛋白质和一个 207 kDa 的通读蛋白。ORF 的 N 端部分含有甲基转移酶和解旋酶活性模体，通过弱的 UAA 终止密码子的通读而产生的 C 端部分含有一个 RdRp 模体。

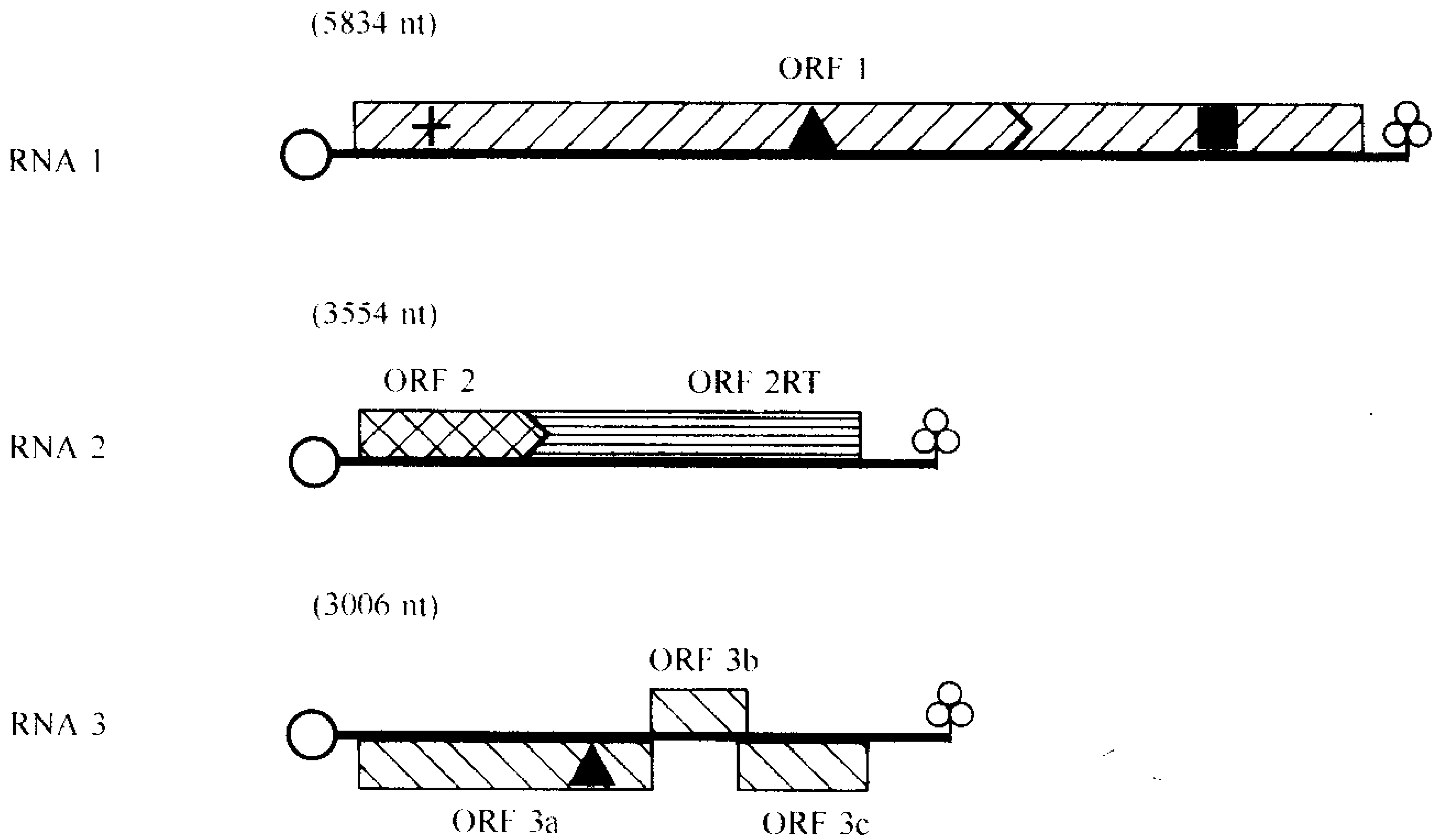


图 6.48 马铃薯帚顶病毒属的甜菜土传病毒（BSBV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组，5′端圆圈表示有帽子，3′端的三叶草结构表示类 tRNA 结构，▲表示解旋酶模体，❯表示有终止密码子的通读，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识，框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

RNA 2 的 5′端部分编码 20 kDa 衣壳蛋白，UAG 终止密码子的通读产生一个 104 kDa衣壳融合蛋白（capsid fusion protein）。RNA 3 含有 3 个 ORF，形成一个分别编码 48 kDa、13 kDa 和 22 kDa 蛋白质的三基因块，参与病毒在细胞间的传播。

13. 甜菜坏死黄脉病毒属（*Benyvirus*）(Tamada, 1999)

甜菜坏死黄脉病毒（BNYVV）的基因组由 5 组分正单链 RNA 组成，编号为 1～5，并按大小递减。这 5 条 RNA 都有 5′端帽子和 3′poly(A)尾。其中 4 条 RNA 的核苷酸全

序列已确定（Bouzoubaa *et al.*，1985，1986，1987；Kiguchi *et al.*，1996）（图 6.49）。5′序列都以帽子后的 AAA 序列开始。5 条 RNA 的 3′端的 60 个核苷酸显示出很高的序列同源性。该病毒的可侵染性基因组包含在 RNA 1 和 RNA 2 中；RNA 3～RNA 5 参与症状表现和介体传播（参见第 14 章第Ⅱ节 B. 3. c）。

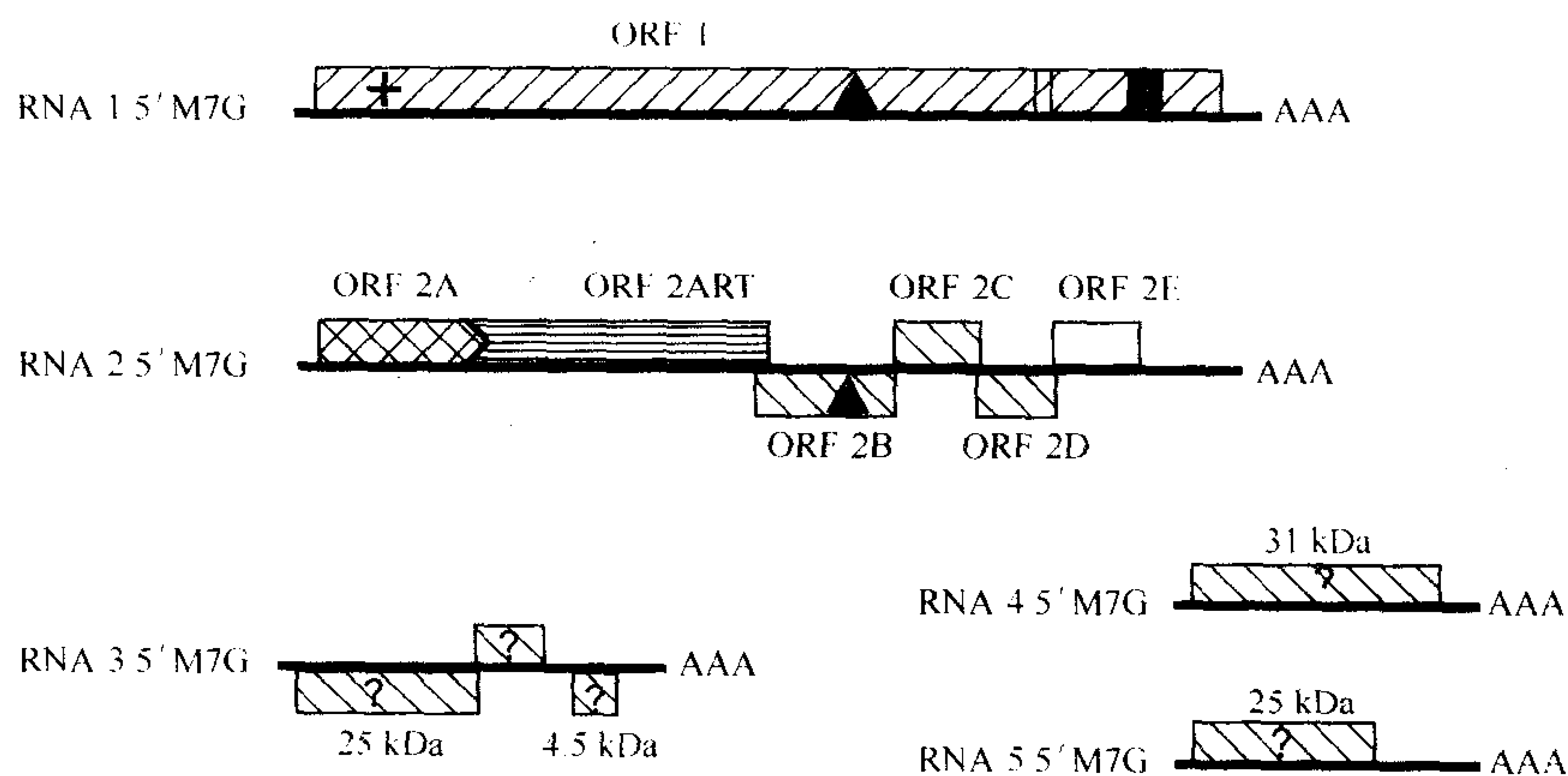


图 6.49 甜菜坏死黄脉病毒属的典型种甜菜坏死黄脉病毒（BNYVV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组，3′端 AAA 表示有 poly(A)尾，+ 表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，‖ 表示蛋白酶模体，❯表示有终止密码子的通读，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

RNA 1 有一个编码大约 237 kDa 多聚蛋白的 ORF，它含有甲基转移酶、解旋酶和 RdRp 的模体，因此，可以认为是病毒的复制酶蛋白。该蛋白质由位于解旋酶和 RdRp 模体之间的一个类似木瓜蛋白酶的蛋白酶活性加工得到 150 kDa 和 66 kDa 产物。RNA 1 在小麦胚系统中体外翻译得到两个较大的多肽：由 154 位（核苷酸）AUG 起始的 240 kDa 和在 496 位（核苷酸）AUG 起始的 220 kDa。在兔网织红细胞系统中只生成 220 kDa 蛋白质。可是，AUG（154）的前后核苷酸序列（nucleotide context）（参见第 7 章第Ⅴ节 A）比 496 位 AUG 附近的序列更接近植物（起始密码子前后）的共有序列（consensus sequence）（Jupin *et al.*，1988）。

RNA 2 有 6 个 ORF。5′端 ORF 编码 21 kDa 的外壳蛋白，其弱终止密码子 UAG 通读后生成一个 75 kDa 通读蛋白。该通读蛋白参与病毒装配和真菌传播。ORF 2b、ORF 2c 和 ORF 2d 形成一个三基因块，生成 42 kDa、13 kDa 和 15 kDa 蛋白质，参与病毒在细胞间的移动。这 3 个 ORF 的模块由两个亚基因组 RNA 表达。最靠近 3′的 ORF（2e）编码一个14 kDa的锌和核酸结合蛋白，它是由一个单独的亚基因组 RNA 表达的。

RNA3 有 3 个 ORF，即编码 25 kDa 蛋白质的 ORF 3a、与 3a 重叠的参与坏死反应的一个小 3b ORF 和编码 4.5 kDa 蛋白质的 ORF 3c。ORF 3c 由一个亚基因组 RNA 表达。RNA 4 编码一个 31 kDa 蛋白质，而 RNA 5 编码一个 25 kDa 蛋白质。

14. 大麦病毒属（*Hordeivirus*）（Lawrence and Jackson，1999；2000）

a. 基因组结构与编码的蛋白质

大麦条纹花叶病毒（BSMV）的 3 条基因组 RNA 被独特地命名为 α、β 和 γ（图

6.50)。尽管有时为了与其他三分体基因组的病毒一致使用术语 RNA 1、RNA 2 和 RNA 3（按大小递减的顺序），但在本书中，将按照惯例主要使用这些希腊字母名称。这些基因组 RNA 在 5′端有一个 M^7Gppp 帽子（Agranovsky *et al.*，1979），在 3′端有一个类 tRNA 结构，可以和酪氨酸发生氨酰化（Agranovsky *et al.*，1981；Loesch-Fries and Hall，1982）。距 3′端大约 210 核苷酸处有一个 8～30 bp 的内部 poly(A)序列（Agranovsky *et al.*，1982）。

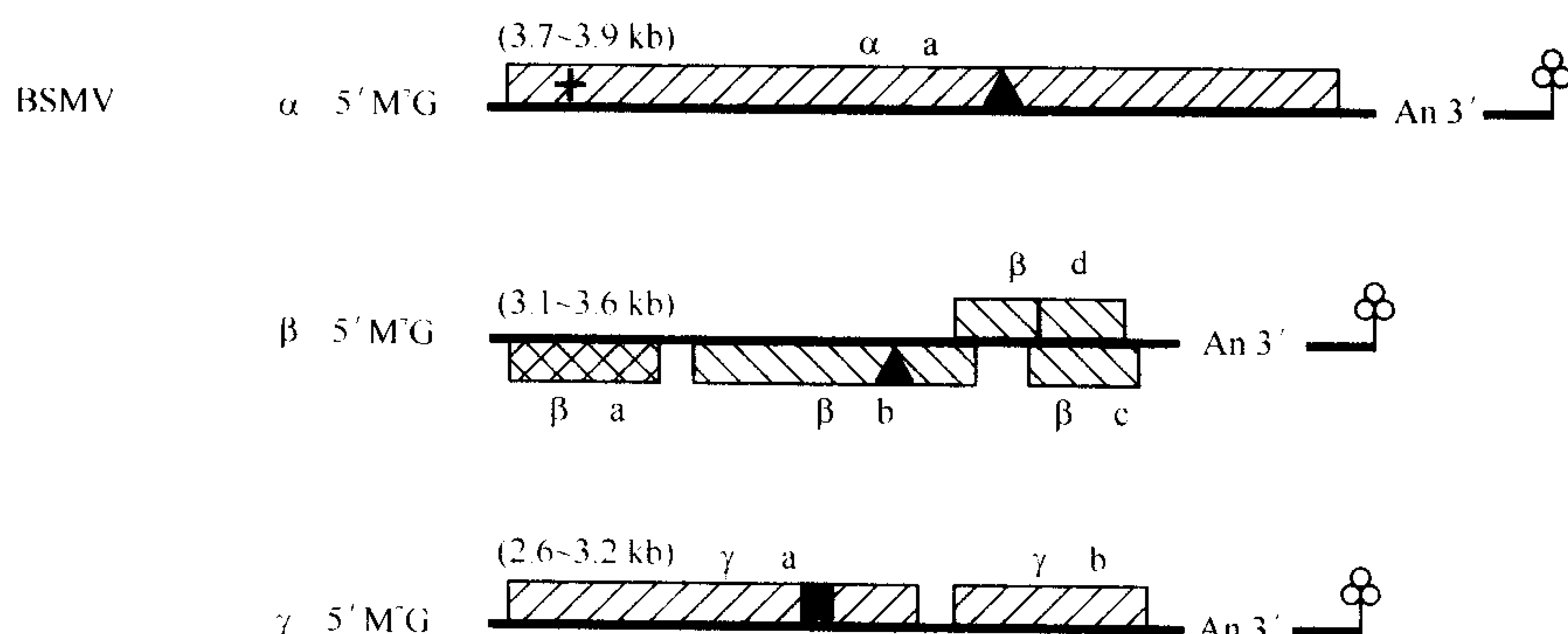


图 6.50 大麦病毒属的典型种大麦条纹花叶病毒（BSMV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组，+ 表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识，框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

i. RNA α

RNA α 在体外翻译仅得到一个 120 kDa 蛋白质（Dolja *et al.*，1983）。全部的序列数据显示这可能是由该 RNA 编码的唯一多肽，其真实大小为 130 kDa，且已被命名为 αa（Gustafson *et al.*，1989）。一个 120 kDa 的病毒特异的蛋白质，可能是 αa 产物，已经在体内发现。αa 基因产物含有甲基转移酶和解旋酶模体，显示出与 BMV RNA 1、AMV RNA 1 的较大蛋白质以及 TMV 的 126 kDa 蛋白质的氨基酸序列相似性。RNA 2 的 ORF βb 编码的 58 kDa 蛋白质中也有一个解旋酶的模体（Gustafson *et al.*，1987）。

ii. RNA β

RNA β 已全部完成测序（Gustafson and Armour，1986）。它有 4 个主要的 ORF，如图 6.50 所示。三个方面的证据显示 RNA 2，特别是 ORF βa，编码 22 kDa BSMV 外壳蛋白：① RNA 2 在体外有效翻译得到外壳蛋白（Dolja *et al.*，1979）；②由核苷酸序列推断出的氨基酸组成（amino acid composition）非常接近实验上确定的外壳蛋白的氨基酸组成；③ 推断的 ORF 2 翻译产物 N 端 30 个氨基酸的序列与通过直接测序确定的 BSMV 外壳蛋白的相应 29 个氨基酸相同。

RNA β 下游的 3 个 ORF 组成一个三基因块，参与细胞间病毒的传播。ORF βb 编码一个 58 kDa 多肽，如上所述，包含一个解旋酶模体。ORF βc 和 ORF βd 的产物分别是 17 kDa 和 14 kDa。BSMV 中 βd 的终止密码子通读得到一个次要的 23 kDa 产物——βd′。ORF βa 由基因组 RNA 表达，βb 由亚基因组 RNA β1 表达，ORF βc、ORF βd和 ORF βd′由亚基因组 RNA β2 表达。

iii. RNA γ

与在 BSMV 的不同株系间长度相对不变的 RNA α 和 RNA β 不同，RNA γ 在不同株系间差异显著。Gustafson 等（1987）测定了典型株系和 ND18 株系的长度不同的两个 RNA γ 的序列。它有两个 ORF，γa 和 γb，被一个顺反子间区（intercistronic region）隔开。典型株系的分子较大是由于在 ORF γa 内有一处符合读框的（in-frame）366 nt 的直接串联重复（direct tandem repeat）。

典型株系的 ORF γa 的翻译产物预测大小是 87 kDa，而 ND18 株系则是 74 kDa。这种株系特异性的差异在这两个株系的体外翻译的多肽上显而易见（Gustafson *et al.*，1981）。根据 ORF γa 的序列推断的氨基酸序列包含 RdRp 模体。因此，BSMV 复制酶复合体中病毒编码的组分包括 ORF αa 和 ORF γa 的产物。

RNA γ 的 3′区域有一个 ORF γb，编码一个 17 kDa 的多肽；该多肽由一个亚基因组 RNA 翻译（Jackson *et al.*，1983）。该 RNA 的起始位点位于顺反子间区内、ORF γb 起始密码子上游 27 个核苷酸处。与其他病毒的亚基因组 RNA 不同，ORF γb RNA 和基因组 RNA 的 3′端不是严格共末端的（co-terminal）。它有一个最多可达 150 nt 的长度可变的 poly(A)末端（Stanley *et al.*，1984）。亚基因组 RNA 的合成据推测是从负链 RNA γ 上的一个内部位点起始的。ORF γb 编码的蛋白质富有含硫的氨基酸（rich in sulfur-containing amino acid），不含有和其他三分体基因组的病毒编码的任何蛋白质相似的序列。该蛋白质是致病性决定因素（pathogenicity determinant），参与调节 RNA β 编码的基因的表达。

综上所述，BSMV 的基因组在以下几个方面不同于其他正义三分体 RNA 基因组病毒：①它编码 7 个蛋白质，而不是 4 个；②外壳蛋白基因位于 RNA β 的 5′端并且由基因组 RNA 翻译；③ RNA γ 的亚基因组 RNA 不是严格与基因组 RNA 共 3′端。

15. 南方菜豆花叶病毒属（*Sobemovirus*）(Sehgal，1999；Tamm and Truve，2000)

南方豇豆花叶病毒（SCPMV）、水稻黄斑驳病毒（RYMV）、鸭茅斑驳病毒（CfMV）、南方菜豆花叶病毒（SBMV）和紫花苜蓿暂时性线条病毒（LTSV）的基因组已完成测序并显示含有单一正义 ssRNA（Wu *et al.*，1987；Yassi *et al.*，1994；Mäkinen *et al.*，1995b；Othman and Hull，1995；Lee and Anderson，1998）。除了 CfMV 之外，所有其他病毒都有一个相似的基因组组构，图 6.51 所示是 SCPMV 的基因组组构。5′端共价连接一个小 VPg（Mang *et al.*，1982）。由 48 个核苷酸组成的前导序列含有一个与 18S 核糖体 RNA 的 3′端部分互补的序列，推测可能在核糖体结合过程中发挥作用。该位点在第一个 AUG 密码子 5′端 7 个碱基处。3′端非翻译区长达 153 nt，没有形成类似 tRNA 的结构的潜力。

该属病毒的基因组 RNA 包含 4 个 ORF。所有南方菜豆花叶病毒属病毒（sobemoviruses）都有在基因组 5′端的 ORF 1 和 3′端的 ORF 4 。ORF 1 的产物（12～18 kDa）参与细胞间病毒的移动（Bonneau *et al.*，1998；Sivakumaran *et al.*，1998），ORF 4 编码病毒外壳蛋白（26～30 kDa）。在大多数南方菜豆花叶病毒属病毒中，ORF 2 编码一个含有丝氨酸蛋白酶和 RdRp 模体的大蛋白质（90～110 kDa）。该 ORF 2 产物从蛋

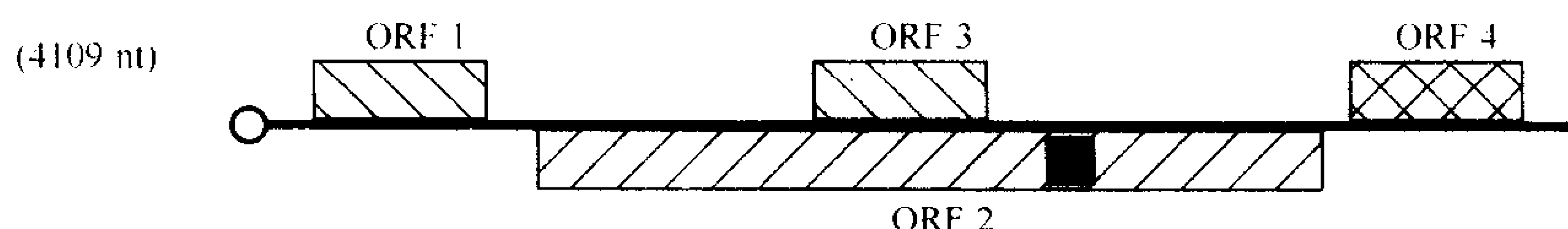


图 6.51 南方菜豆花叶病毒属的南方豇豆花叶病毒（SCPMV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组，5′端圆圈表示有帽子，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

白酶和 RdRp 模体之间的一个区域加工得到 5′VPg（10～12 kDa）。CfMV 的ORF 2包括两个重叠的 ORF——2a 和 2b，通过－1 核糖体移码机制表达一个多聚蛋白（Mäkinen *et al.*，1995a）。蛋白酶模体和 VPg 编码区域位于 ORF 2a 上，RdRp 模体在 ORF 2b 上。大多数南方菜豆花叶病毒属病毒中嵌套于 ORF 2 内的 ORF 3 可以编码一个约 18 kDa 的蛋白质；该蛋白质的功能未知。在 SBMV 的一个株系和 CfMV 中没有该 ORF。

ORF 1 和 ORF 2 由基因组 RNA 表达，ORF 2 大概通过渗漏起始而表达 。ORF 4 由一个亚基因组 RNA 翻译（Ghosh *et al.*，1981）。ORF 3 是否表达以及如何表达都是未知的。

16. 玉米细条病毒属（*Marafivirus*）

玉米细条病毒（MRFV）、燕麦蓝矮病毒（OBDV）和 PnMV 的基因组 RNA 已完成测序（Edwards *et al.*，1997；Bradel *et al.*，2000）。基因组 RNA 3′端被聚腺苷酸化，5′端加帽。含有 2 个 ORF（图 6.52）。5′ ORF 1 编码一个大的多聚蛋白（221～227 kDa），其 N 端部分含有甲基转移酶、类似木瓜蛋白酶的蛋白酶、解旋酶和 RdRp 的活性模体。该大蛋白质的 C 端部分包括两个外壳蛋白之一的 24 kDa 蛋白质。另一个外壳蛋白（21 kDa）由基因组 3′端与 ORF 1 重叠的 ORF 2 编码；ORF 2 的基因产物由一个亚基因组 RNA 翻译。

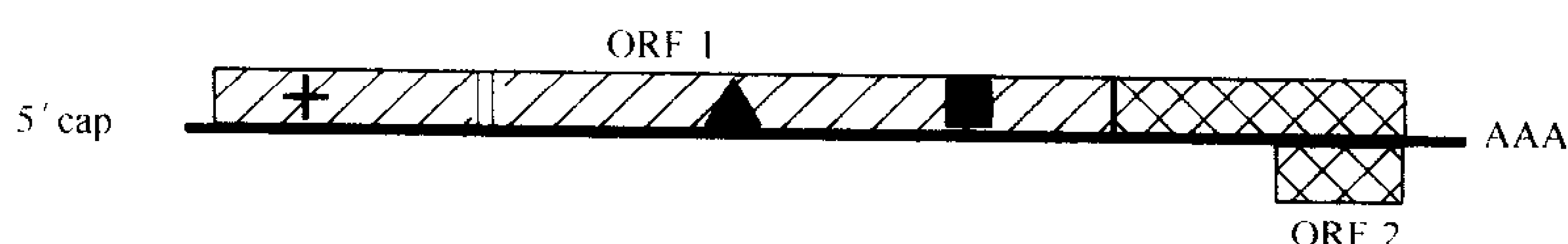


图 6.52 玉米细条病毒属的燕麦蓝矮病毒（OBDV）基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组，3′端 AAA 表示 poly(A)尾，+ 表示甲基转移酶模体的位置，‖ 表示蛋白酶模体，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

17. 芜菁黄花叶病毒属（*Tymovirus*）（Gibbs，1999）

芜菁黄花叶病毒基因组为线性的正义 ssRNA，5′端加帽，3′端有一个可接受缬氨酸的类 tRNA 结构。芜菁黄花叶病毒 RNA 的特征是胞嘧啶含量很高（31%～42%）。

其基因组组构相当紧凑（图 6.53）。以欧洲的 TYMV 为例，其 6318 个核苷酸中只有 192（3%）个是非编码的。最大的 ORF——ORF 1，在 95 位核苷酸处起始，利用

一个 UAG 密码子终止于 5627 位核苷酸（得到一个 206 kDa、含有 1844 个氨基酸的蛋白质）。该 206 kDa 蛋白质含有一个典型的甲基转移酶、类似木瓜蛋白酶的蛋白酶、解旋酶和 RdRp 的模体。该蛋白质经加工可形成一个 141 kDa 和一个 66 kDa 的产物。

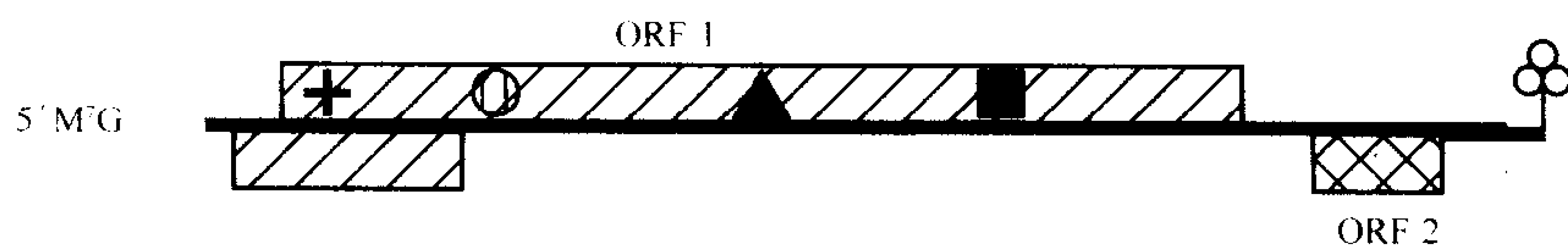


图 6.53　芜菁黄花叶病毒属的典型种芜菁黄花叶病毒（TYMV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组，3′端的三叶草结构表示类 tRNA 结构，+ 表示甲基转移酶模体的位置，◐表示蛋白酶模体，▲表示解旋酶模体，最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

第二个 ORF——ORF 2，从 RNA 上的第一个 AUG 处起始（从核苷酸 88 开始）并且通过一个 UGA 终止于 1972（69 kDa；628 个氨基酸）。它以与外壳蛋白基因相同的读框与 ORF 1 重叠。外壳蛋白基因（ORF 3）位于病毒基因组的 3′端。由 105 个核苷酸组成的非编码 3′区域包含一个 tRNA 类似结构。

ORF 1 和 ORF 2 均是通过渗漏起始（leaky initiation）机制来表达基因组 RNA 的。外壳蛋白由一个亚基因组 RNA 翻译，该亚基因组 RNA 与基因组 RNA 一同包裹而且存在于一系列部分填充的粒体中（Pleij *et al.*，1977）。体内检测不到在长度上与该亚基因组 RNA 相对应的双链 RNA。Gargouri 等（1989）在基因组长度的 dsRNA 上可以检测到新生的外壳蛋白的亚基因组正链 RNA。因此，外壳蛋白 mRNA 在体内是通过基因组长度的负链内部起始而合成的。Ding 等（1990b）通过对所有芜菁黄花叶病毒属病毒的亚基因组 mRNA 起始位点附近已有的核苷酸序列的比较，发现了两个保守区域，分别为起始位点的（CAAU/C）和其 5′端的一个 16 个核苷酸的序列（GAGUCUGAAUUGCUUC）。他们称之为“*tymobox*”的较长序列，可能是调控亚基因组 RNA 合成的启动子的一个重要组分。

18. 悬钩子病毒属（*Idaeovirus*）（Mayo and Jones，1999b）

悬钩子病毒属病毒（idaeoviruses）的基因组为二分体正义 ssRNA（图 6.54）。RNA 1 含一个编码 190 kDa 蛋白质的大 ORF。该蛋白质包含了甲基转移酶、解旋酶和 RdRp 活性模体，因而应是病毒的复制酶。RNA 1 上有一个小的 12 kDa ORF，与大的 ORF 重叠；该 ORF 是否表达尚不清楚。RNA 2 含有两个 ORF。5′ORF 编码的 39 kDa 蛋白质推测是细胞间移动蛋白，3′ ORF 编码 30 kDa 外壳蛋白。外壳蛋白是由一个 946 nt 的亚基因组 RNA 表达的。

19. 欧尔密病毒属（*Ourmiavirus*）

该属病毒的基因组为线状的正义 ssRNA，它由 3 个大约为 3.0 kb、1.1 kb 和 1.0 kb的片段组成（Accotto *et al.*，1997）。除了外壳蛋白是由 RNA 3 编码外，对于其基因组组构现在仍是一无所知。

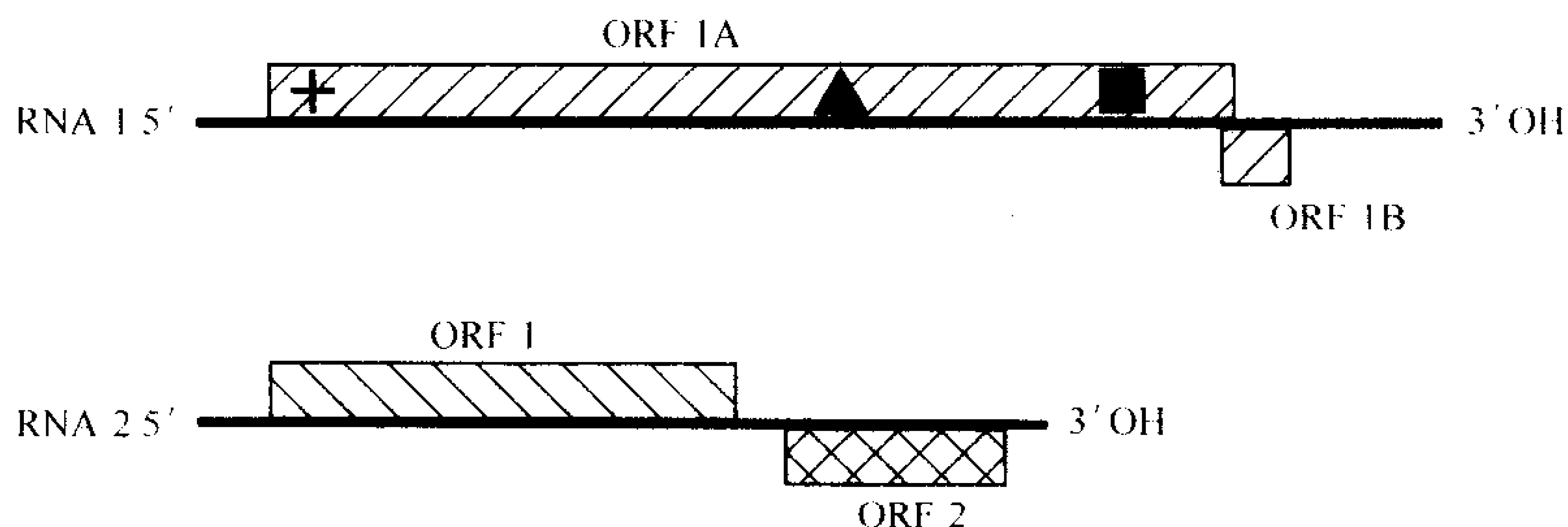


图 6.54 悬钩子病毒属的典型种悬钩子丛矮病毒（RBDV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组，+ 表示甲基转移酶模体的位置，▲表示解旋酶模体，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

20. 幽影病毒属（*Umbravirus*）（Robinson and Murant，1999）

幽影病毒属病毒并不形成常规的病毒粒体，除非它们与一个辅助病毒联合。有 3 个成员的基因组已完成测序：花生丛簇病毒（GRV）（Taliansky *et al.*，1996）、胡萝卜拟斑驳病毒（CMoMV）（Gibbs *et al.*，1996）以及豌豆耳突花叶病毒 2 号（PEMV-2）（Demler *et al.*，1993）。GRV 的基因组含有 4 个 ORF（图 6.55）。ORF 1 编码一个 31 kDa蛋白质，且很可能通过移码、翻译继续进入 ORF 2 从而产生一个 95 kDa 产物。该产物的 ORF 2 区域包括一个 RdRp 的模体，因此据认为它可能是病毒的复制酶。ORF 3 的 27 kDa 产物功能未知。ORF 4 编码的 28 kDa 蛋白质具有细胞间移动的功能。幽影病毒基因组缺乏可能的外壳蛋白基因。

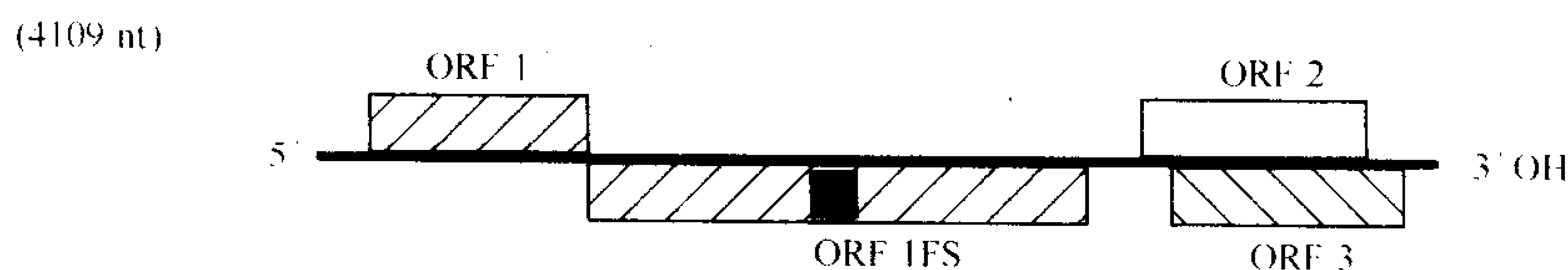


图 6.55 幽影病毒属的花生丛簇病毒（GRV）的基因组组构。单线条代表正单链 RNA 基因组，■表示 RdRp 模体。最终基因产物的编码区由框标识。框中填线类型表示各 ORF 编码产物的功能。具体说明请见图 6.1。

第Ⅸ节　总结与讨论

如第Ⅱ节 A 部分所述，ORF 的传统定义为：它是一个以 AUG 起始密码子开始，能够表达一个 10 kDa 或更大的蛋白质的编码区。一些近年的研究结果显示，该定义是有局限性的，可能导致对有功能 ORF 的忽视。这些局限性包括：

（1）已经发现几个小于 10 kDa 的 ORF 也是有功能的，如马铃薯 X 病毒的 ORF 4、甜菜黄化病毒（BYV）的 ORF 2。

（2）已经发现几个 ORF 是由非正常的密码子起始的，如 RTBV ORF 1 中的 AUU。

（3）通过移码或通读事件可以由两个（或更多）小的 ORF 来生成一个大 ORF。

从以上各节的描述可以看出植物病毒的基因组组构有很大的不同，表 6.6 中的数据

强调说明了这一点。

表 6.6　植物病毒编码的蛋白质

病毒科/属	复制酶	外壳蛋白	移动蛋白	介体蛋白	抑制因子蛋白	其他蛋白质
Caulimoviridae 花椰菜花叶病毒科	+	+	+	+		+
Geminiviridae 双生病毒科	(+)[a]	+	+	(+)[c]		+
Nanovirus 矮缩病毒属						
Reoviridae 呼肠孤病毒科						
Partitiviridae 双分病毒科	+	+	—	—		
Rhabdoviridae 弹状病毒科	+	(+)[b]	+	+		
Tospovirus 番茄斑萎病毒属	+	(+)[b]	+	+		+
Tenuivirus 纤细病病毒属	+	(+)[b]				+
Bromovirus 雀麦花叶病毒属	+	+	+			
Cucumovirus 黄瓜花叶病毒属	+	+	+	(+)[c]	+	
Alfamovirus 苜蓿花叶病毒属	+	+	+	(+)[c]		
Ilarvirus 等轴不稳定环斑病毒属	+	+	+		+	
Oleavirus 油橄榄病毒属	+	+	+			
Comovirus 豇豆花叶病毒属	+	+	+			+
Nepovirus 线虫传多面体病毒属	+	+	+			+
Potyviridae 马铃薯Y病毒科	+	+	+	+		+
Tombusvirus 番茄丛矮病毒属	+	+	+			+
Aureusvirus 绿萝病毒属	+	+	+			+
Avenavirus 燕麦病毒属	+	+				+
Comovirus 豇豆花叶病毒属	+	+	+			
Dianthovirus 香石竹病毒属	+	+	+			
Machlomovirus 玉米褪绿斑驳病毒属	+	+				+
Necrovirus 坏死病毒属	+	+	+			+
Panicovirus 黍病毒属	+	+	+			+
Closterovirus 长线病毒属	+	+	+	+		+
Crinivirus 毛形病毒属	+	+	+	+		+
Luteovirus 黄症病毒属	+	+	+	+		+
Polerovirus 马铃薯卷叶病毒属	+	+	+	+		+
Enamovirus 耳突花叶病毒属	+	+	+	+		+
Tobamovirus 烟草花叶病毒属	+	+	+			
Tobravirus 烟草脆裂病毒属	+	+	+			+
Potexvirus 马铃薯X病毒属	+	+	+			
Carlavirus 香石竹潜隐病毒属	+	+	+			+
Allexivirus 葱X病毒属	+	+	+			+
Capillovirus 发样病毒属	+	+	+			
Foveavirus 凹陷病毒属	+	+	+			
Trichovirus 纤毛病毒属	+	+	+			
Vitivirus 葡萄病毒属	+	+	+			+
Furovirus 真菌传杆状病毒属	+	+	+	+		+
Pecluvirus 花生丛簇病毒属	+	+	+	+		+
Pomovirus 马铃薯帚顶病毒属	+	+	+			
Benyvirus 甜菜坏死黄脉病毒属	+	+	+	+		+
Hordeivirus 大麦病毒属	+	+	+			+
Sobemovirus 南方菜豆花叶病毒属	+	+	+			+
Marafivirus 玉米细条病毒属	+	+				
Tymovirus 芜菁花叶病毒属	+	+				
Idaeovirus 悬钩子病毒属	+	+	+			+
Umbravirus 幽影病病毒属	+	—	+			+

注：a. 起始寄主复制酶的蛋白质（protein that initiate host replicase）；b. 核衣壳（nucleocapsid）；c. 外壳蛋白决定的介体专化性（vector specificity by coat protein）。"＋"＝存在；"－"＝不存在；空格＝未知。

对于植物 RNA 病毒基因组的多样性，Zaccomer 等（1995）已经探讨过。但是，基因组组构还是存在着一些基本的特征。一个病毒基因组不论是来自高等或低等植物、高等或低等动物抑或是细菌，基本上都是由各种各样的序列组件（盒，cassette）组成的。基本的序列组件包括基因以及基因组复制和表达所需的核酸序列。主要包括复制酶、从侵入的病毒基因组形成一个新基因组中的起始和（或）终止序列、调控表达的序列和（或）蛋白质。除复制盒外还附加有调控复制和使病毒适应其寄主的基因和（或）核酸序列盒。因为病毒是完全依赖其寄主实现自身的增殖，所以调控其复制和尽可能地维持其自然寄主的生活状态据认为对其是有利的。成功侵染植物的病毒必须能够从最初受侵染的细胞移动到植物的大多数（如果不是所有的）细胞中并且控制或抑制植物的所有防御系统。它们也必须能够从受侵染寄主中移动到健康的寄主中。因此，需要有单个基因或一群基因使病毒在植物体内以及植物间移动。后者（参与植物间移动的基因）包括当病毒处于寄主细胞之外的环境时可以保护其基因组核酸不被降解的基因产物，一般是病毒的外壳蛋白（借用辅助病毒的外壳蛋白的幽影病毒除外），常常还包括促进病毒与其介体的相互作用的一个或多个基因产物。参与植物内部和植物间移动的基因将在第 9、11、12 章详细讲述。植物有针对“外源”核酸的防御系统，而成功的病毒必须克服这一屏障，相关内容将在第 10 章中讲述。

因此，“基本的”（basic）病毒需要复制其基因组所需的一个或多个蛋白质盒，一个或多个外壳蛋白，一个在植物内移动所需的一种或多种蛋白质的盒，如果它有一个传播介体，可能还需要一个与之相互作用的一个或多个蛋白质（可能是外壳蛋白）的盒。除了这些盒外，许多病毒还含有一些克服寄主内在防御系统的蛋白质。

表 6.6 总结了关于不同科及属的植物病毒所编码蛋白质的现有知识。数个病毒属拥有该“基本”组构。也许最“基本”的是隐潜病毒（cryptoviruses）[双分病毒科（*Partitiviridae*）]，它只编码一个复制酶和外壳蛋白。它们依靠其侵染分生组织细胞的能力在植株内侵染新细胞，依靠其高种子传播率转移到新的地点。

多数病毒组群的细胞间移动蛋白已经得到鉴定。对于没有确定移动蛋白的病毒，都存在一些功能未知的蛋白质。如第 9 章中将要详细探讨的，细胞间的移动或者由一个单一蛋白质或者由一个称作三基因块的三种蛋白质的盒介导。

如第 11 章中所述，病毒与其无脊椎动物或真菌介体间存在着特异性的相互作用。主要是利用主要外壳蛋白的表面序列，利用整合进衣壳的一个经过部分修饰的外壳蛋白，或者是通过一个联系病毒外壳蛋白和介体内特异位点的辅助蛋白。

许多病毒组群都有一些其他功能的蛋白质。以一个多聚蛋白形式表达全部或部分遗传信息的病毒编码一个或多个蛋白酶，经过加工得到最终产物，这些将在第 7 章讲述。可能的功能包括：① 细胞间移动；② 新近鉴定的数个病毒组群的一些蛋白质（如黄瓜花叶病毒属成员的 2b 蛋白）可以抑制寄主的防御系统；③调控病毒基因组表达的蛋白质。

本章讲述了可能是单个基因或一组基因的个别序列盒的功能。然而，日渐明显的是很少有基因产物单独靠自身发挥作用。第 13 章中将讲到，病毒侵染循环是一个高度综合的过程，每个基因产物（以及非编码序列）都会与数个其他产物相互作用。

第7章　病毒基因组的表达

在前几章里，我们讨论了病毒及其基因组的结构。本章，我们开始讲述这些基因组是如何发挥功能的。为了更好的介绍这个主题，我们先把病毒复制的几个主要阶段做一个简单的概述。

（1）病毒粒体首先进入寄主细胞，病毒粒体在侵入细胞时或者刚侵入后，病毒的基因组会立即从蛋白外壳中释放出来或粒体结构变得松弛，使其能够进入复制的下一个阶段。

（2）如果侵入的基因组是正义 ssRNA，可以直接翻译（或者先形成 mRNA 然后再翻译）早期蛋白如复制酶，也可能还有其他的病毒特异性蛋白质，本章将论述这方面的内容。

（3）如果基因组表达策略需要亚基因组 mRNA，则病毒的复制酶或复制相关蛋白质可以合成亚基因组 mRNA。本章也将论述这方面的内容。

（4）病毒的复制酶或复制相关蛋白质合成新的病毒基因组。相关内容将在下章论述。

（5）一些在病毒复制循环的后期需要的蛋白质如外壳蛋白及细胞间移动蛋白在侵染的后期合成。

（6）外壳蛋白亚基和病毒基因组一起装配形成新的病毒粒体，这些病毒粒体通常在细胞质中积累。这方面的内容已在第5章中论述过。

（7）病毒的侵染性单位（infectious unit）从初侵染的细胞移动到邻近细胞，甚至整个植株，从而起始病毒的系统性侵染。这方面的内容将在第9章中加以论述。

第Ⅰ节　导言

病毒基因组都是通过 mRNA 表达出来的，这些 mRNA 有两种主要来源：①正义 ssRNA病毒的基因组核酸可直接作为 mRNA；②负义 ssRNA、dsRNA、dsDNA 和 ssDNA的转录物。Baltimore（1971）指出无论病毒基因组是 RNA 还是 DNA、单链还是双链、正义还是负义，所有病毒基因组的表达都是以 mRNA 为中心的（图7.1）。

当包装完整的病毒粒体侵入感病的寄主植物细胞后，基因组必须从相当稳定的蛋白外壳中释放出来。这些蛋白外壳又是病毒在寄主之间的移动所必需的。一旦病毒基因组被释放出来，如果是正义 RNA 可以直接翻译表达，如果不是正义 RNA 就需要先形成 mRNA。

病毒 mRNA 的表达受到真核翻译系统的各种约束，这将在第Ⅴ节 A 部分讲述。

本章将重点论述以下几方面的内容：病毒在侵入寄主细胞后如何将基因组释放出来、如何表达其遗传信息、如何克服寄主翻译系统的束缚以及表达的调控策略等。

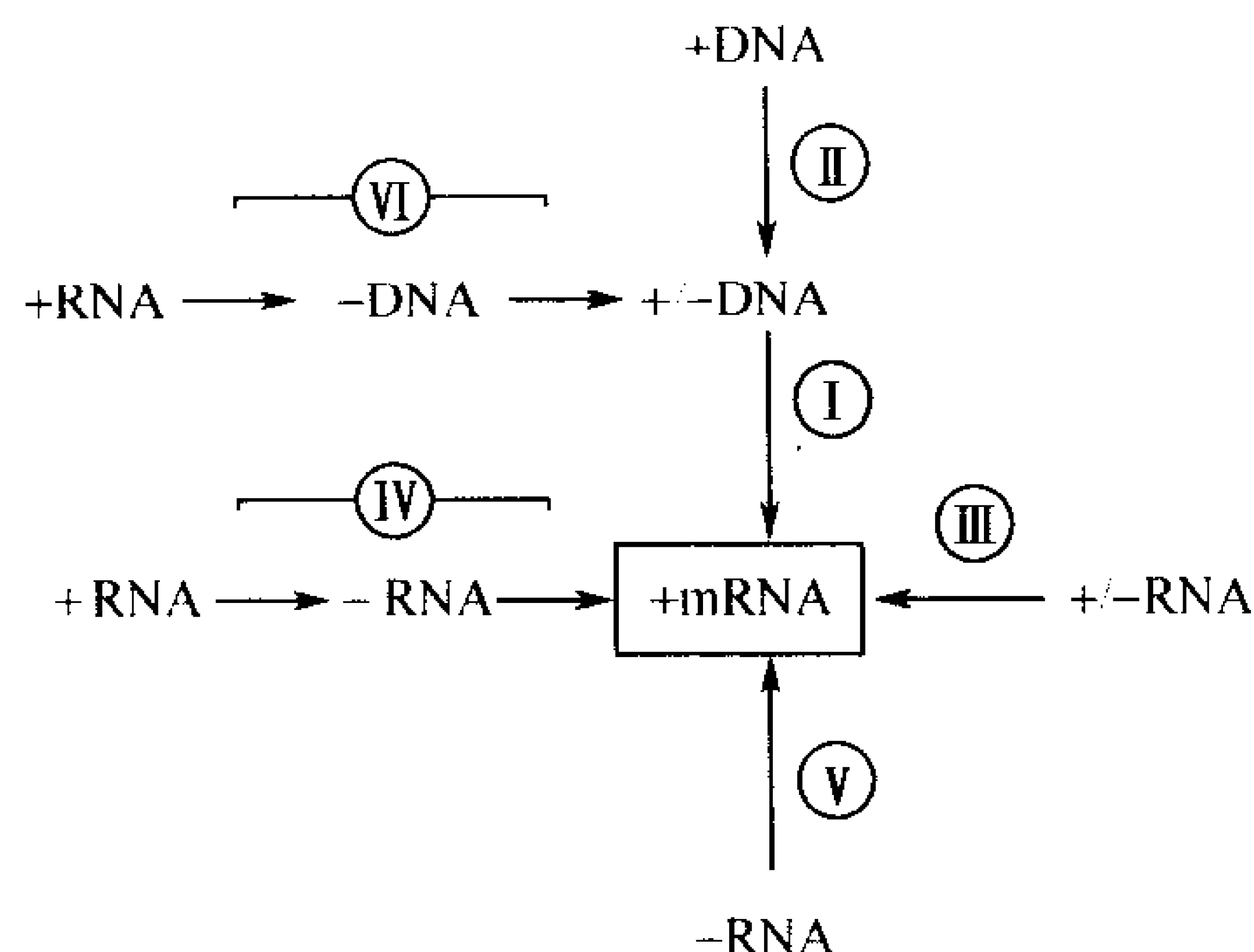


图7.1 病毒基因组通过mRNA得以表达的途径。途径Ⅰ：通常由寄主的依赖于DNA的RNA聚合酶对dsDNA进行转录；途径Ⅱ：ssDNA的转录产生途径Ⅰ所需的dsDNA模板（如双生病毒，geminiviruses）；途径Ⅲ：dsRNA的转录通常由病毒自身编码的RdRp完成（如呼肠孤病毒reoviruses）；途径Ⅳ：病毒编码的RdRp通过负链模板合成正链RNA——而病毒正链RNA通常是早期蛋白翻译的模板（正链RNA病毒）；途径Ⅴ：由病毒编码的RdRp完成负链RNA病毒基因组的转录（如番茄斑萎病毒属病毒，tospoviruses）；途径Ⅵ：反转录病毒（retroviruses）及副反转录病毒（pararetroviruses）在RNA阶段反转录形成dsDNA，然后以dsDNA为模板转录出mRNA。经允许，引自Baltimore（1971）。

第Ⅱ节　病毒侵入及脱壳

A. 侵入

在第11章和第12章中将讨论，病毒在进入植物细胞之前需要破坏角质层和细胞壁，病毒通过各种各样的方式进入细胞以建立侵染（Shaw，1999）（图7.2）。

至今还没有证据表明植物病毒的侵入方式是通过质膜（plasma membrane）受体和内吞等特异的方式，一般认为“植物病毒是通过机械方式进入细胞的”（Shaw，1999）。

B. TMV的脱壳过程（Shaw，1999）

1. 在完整叶片中的早期事件

植物叶表面的性质、机械创伤的必要性及其过程的效率和侵染完整叶片的其他方面都将在第12章讨论。科学家已经利用放射性标记TMV的蛋白质或核酸或二者均标记来直接研究TMV的脱壳过程（Shaw，1973；Hayashi，1974）。从这些实验中得出如下结论：

（1）在接种后的几分钟内，保留在叶面上的病毒中，大约有10%的RNA会从病毒粒体中释放出来。

（2）尽管大多数RNA被降解，但是还可以检测到全长RNA。

（3）在细胞内部，蛋白质至少从病毒粒体的两个位置脱落（Shaw，1973）（与本节B.2部分对比）。

（4）在此过程的早期，没有已存在的或病毒诱导生成的酶参与（Shaw，1969）。

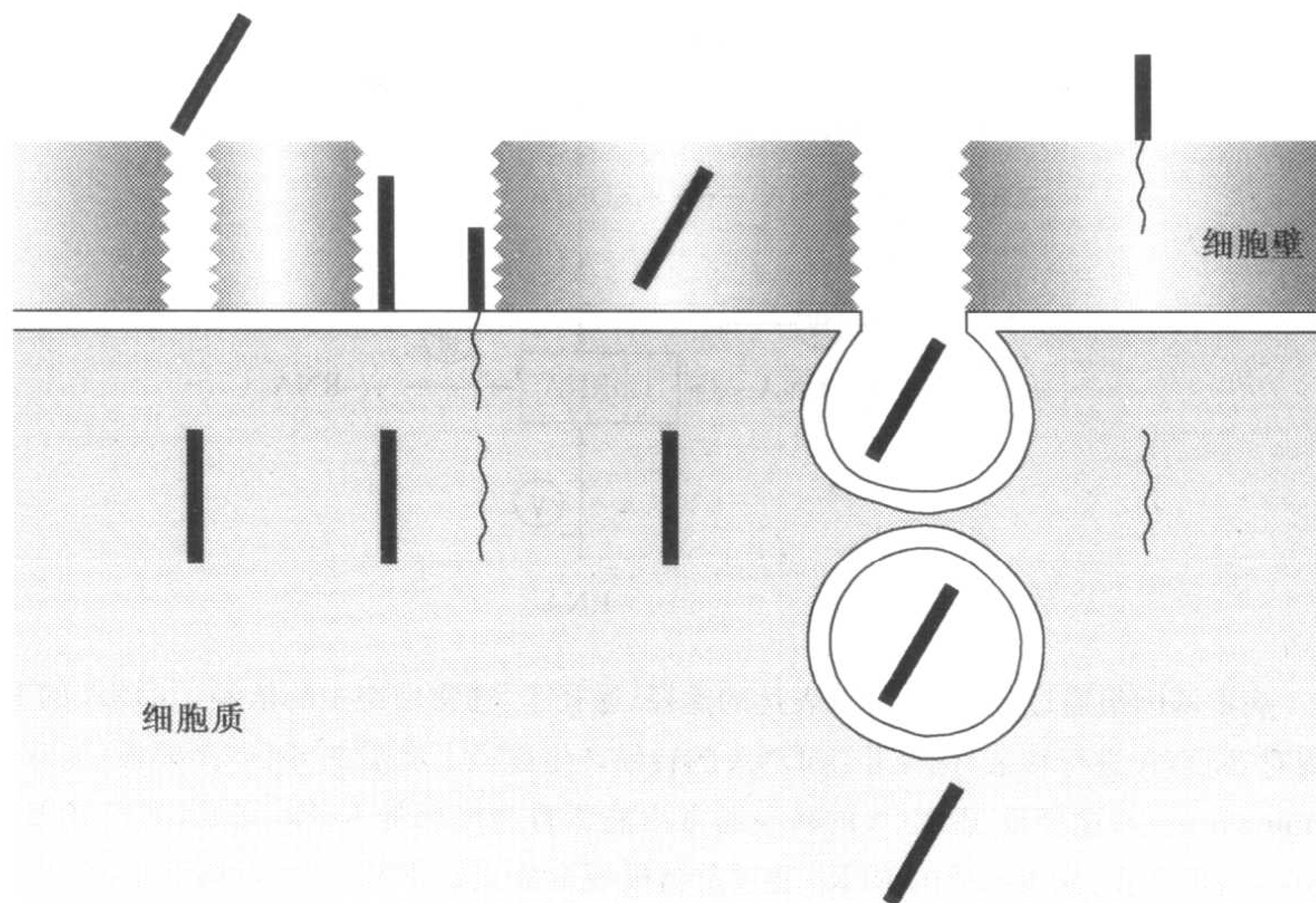


图7.2　TMV病毒粒体在叶部摩擦接种时进入细胞的可能途径。所有这些途径目前都还未被直接证明。从左至右：病毒粒体通过伤口直接侵入；病毒粒体附着到细胞膜上而后以粒体或RNA的形式进入细胞；经由外(壁胞质)连丝(ectodesmata)或"泡"(bleb)，病毒粒体通过细胞壁；病毒粒体附着在细胞膜上通过膜的内陷进入细胞并形成内吞小泡(endocytotic vesicle)；病毒粒体吸附于外部细胞壁以及病毒RNA通过细胞壁进入细胞。承蒙版权所有者(The Royal Society)惠允，引自Shaw(1999)。

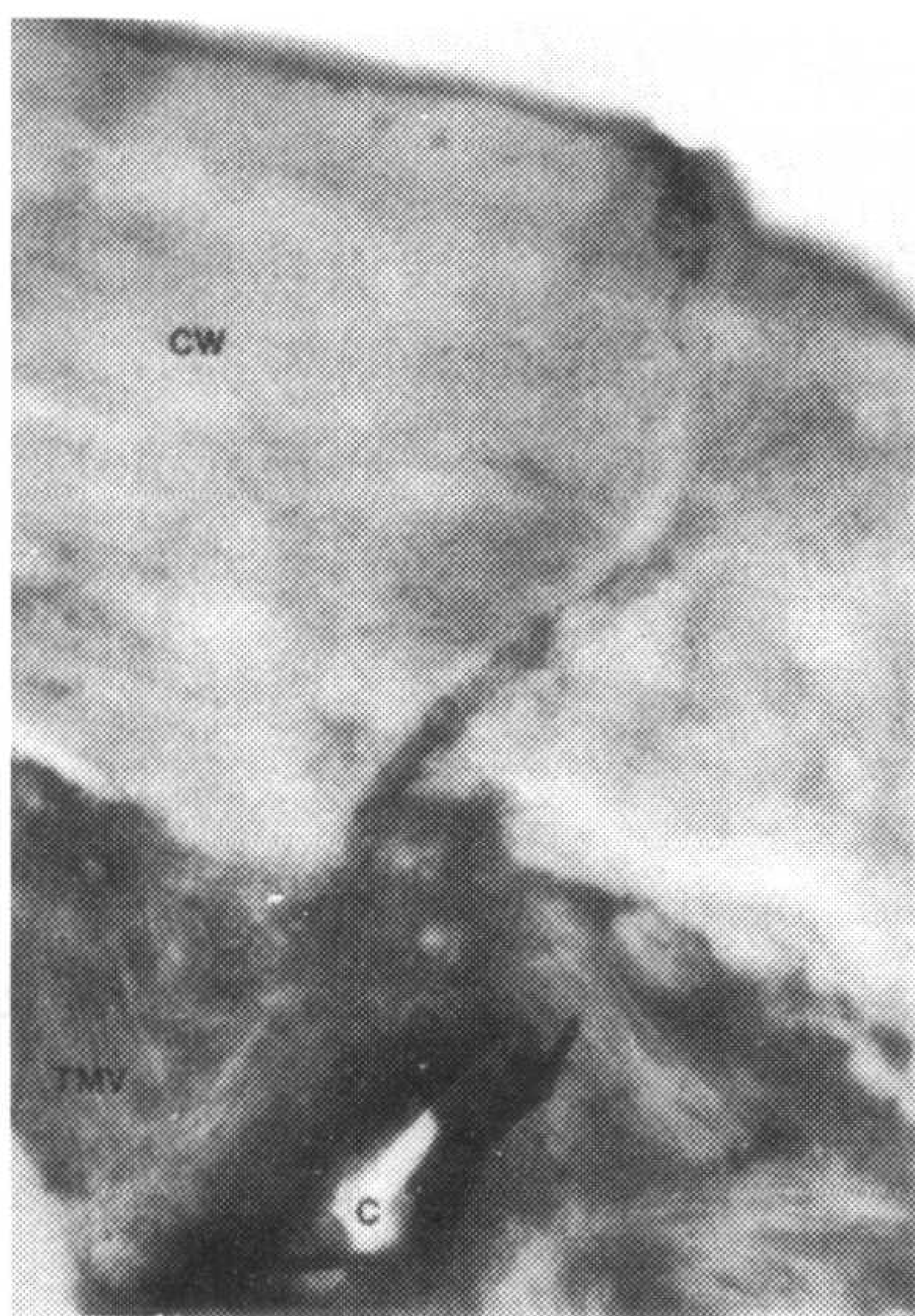


图7.3　TMV病毒粒体通过磨料(硅藻土)摩擦造成的伤口进入烟草叶下表皮细胞。接种后立即将叶组织切下并加以固定。细胞质中可见大量的杆状的病毒粒体(TMV)。CW＝细胞壁；C＝硅藻土。承蒙版权所有者(The American Phytopathological Society)惠允，引自Plaskitt等(1987)。

(5) 这些过程至少在早期阶段是没有寄主特异性的。

然而，值得注意的是这些实验过程存在很大的难度。必须用高浓度的病毒接种体来提供足够的病毒侵染植物细胞以保证分析的准确性，这就意味着大量的病毒粒体会迅速进入细胞（图7.3）。不可能确定这些病毒粒体中哪些能够建立侵染。

2. 病毒的体外解装配

为了起始侵染过程，TMV RNA必须通过脱壳被释放出来或者至少释放出基因组的一部分足以使第一个可读框（ORF）能够翻译表达。科学家在体外的非生理条件（non-physiological condition）下，已经做了很多有关TMV的体外解装配（disassembly）实验。例如，碱或去污剂（1%十二烷基硫酸钠，SDS）就可以使TMV基因组RNA的5′端（粒体有凹陷的一端）的蛋白亚基脱落（Perham and Wilson，1976）。但是，在这类试剂控制的解装配过程常常会产

生一系列不同长度的亚病毒杆状粒体（subviral rod）（Hogue and Asselin，1984）。在 pH 9.0 的条件下，各种阳离子会减慢或阻止脱壳过程（Powell，1975）。据 Durham 等（1977）报道，在细胞中，二价钙离子（Ca^{2+}）结合位点在 TMV 的解装配过程可能起着关键作用。去除 Ca^{2+} 将会使蛋白亚基的构形发生变化，最终导致其解装配。Durham（1978）提出 TMV（以及其他小病毒）可能在细胞膜上或细胞膜内部实现解装配过程。病毒所处的基质的 Ca^{2+} 浓度，在细胞外约为 10^{-3} mol/L，而在细胞内约为 10^{-7} mol/L。离子的稀释能够提供自由能（free energy）因而破坏蛋白亚基内部的键，这个论点还需要进一步的证实。

Wilson（1984a）发现在 pH 8.0 的溶液中短暂处理 TMV 之后，将处理的病毒在依赖于mRNA的兔网织红细胞裂解物（reticulocyte lysate）中温育可使多肽合成发生（图 7.4）。

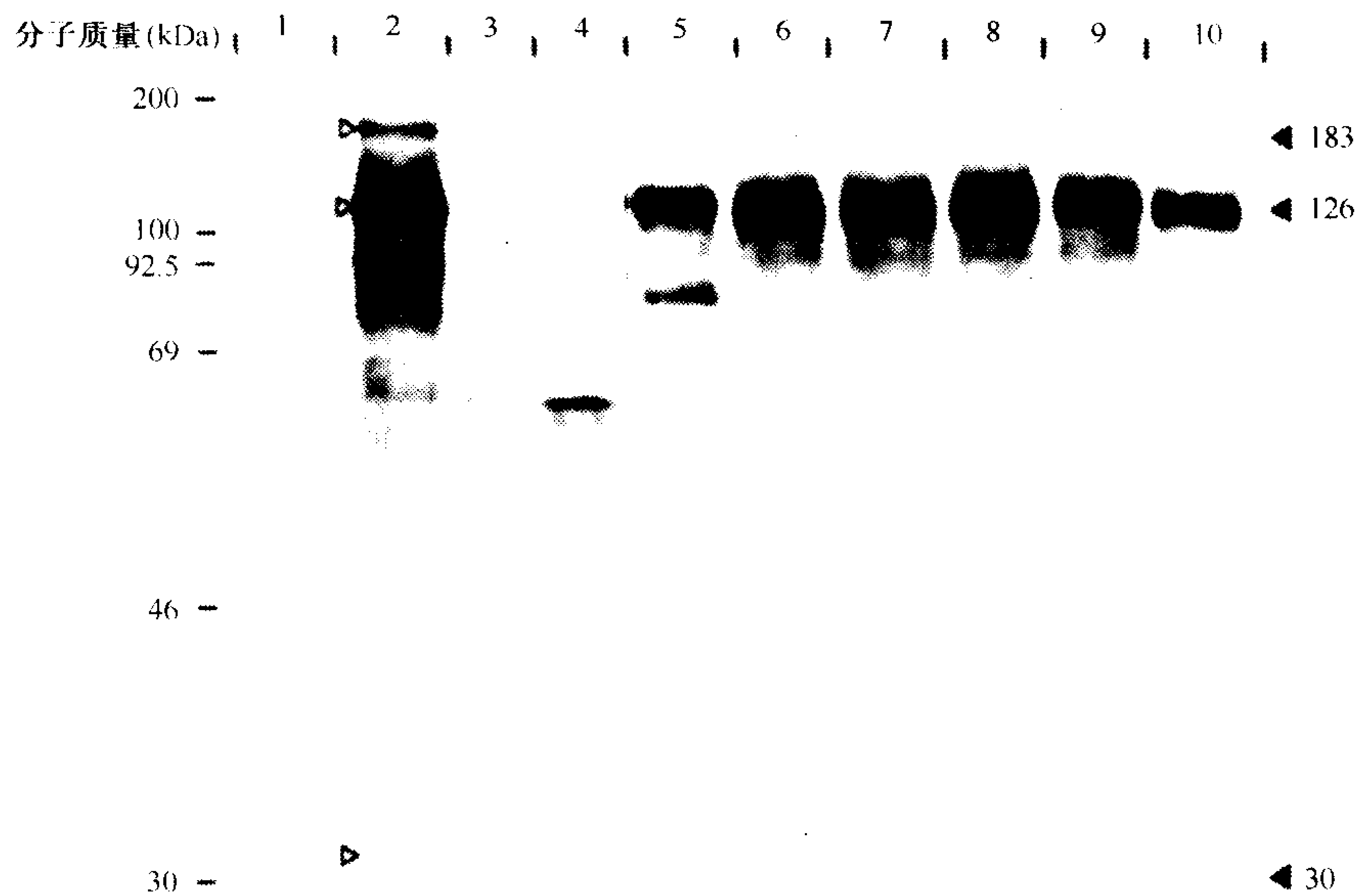


图7.4　TMV 的体外共翻译解装配(cotranslational disassembly)。TMV RNA(泳道2)或者在 pH 8.0～8.2的缓冲液中预处理纯化的 TMV 粒体(5～10泳道)无细胞系统翻译产物的电泳分析。左边的数字说明了分子质量标记(marker)的位置；右边的数字指示 TMV 蛋白的位置。126 kDa 产物的出现为共翻译解装配机制提供了证据。经允许，引自 Wilson(1984)。

Wilson 据此提出：碱处理使病毒杆状粒体的 5′端不稳定，足以使核糖体附着到基因组的 5′端前导序列并且沿着 RNA 向 3′端移动；一边翻译表达，一边是蛋白外壳解装配。他将该过程称为“共翻译解装配”（co-translational disassembly），并将核糖体部分剥离的杆状粒体复合体称之为脱壳体（striposome）（图 7.5），并认为在体内也可能有类似的脱壳机制。

与网织红细胞裂解物系统形成对照的是，在麦胚（wheat germ）系统中经 pH 8.0 处理的病毒合成的多肽量是采用分离的 TMV RNA 合成多肽量的 3 倍。其原因可能是病毒在脱壳之前，位于杆状粒体内的 RNA 受到保护，免受核酸酶的降解（Wilson，

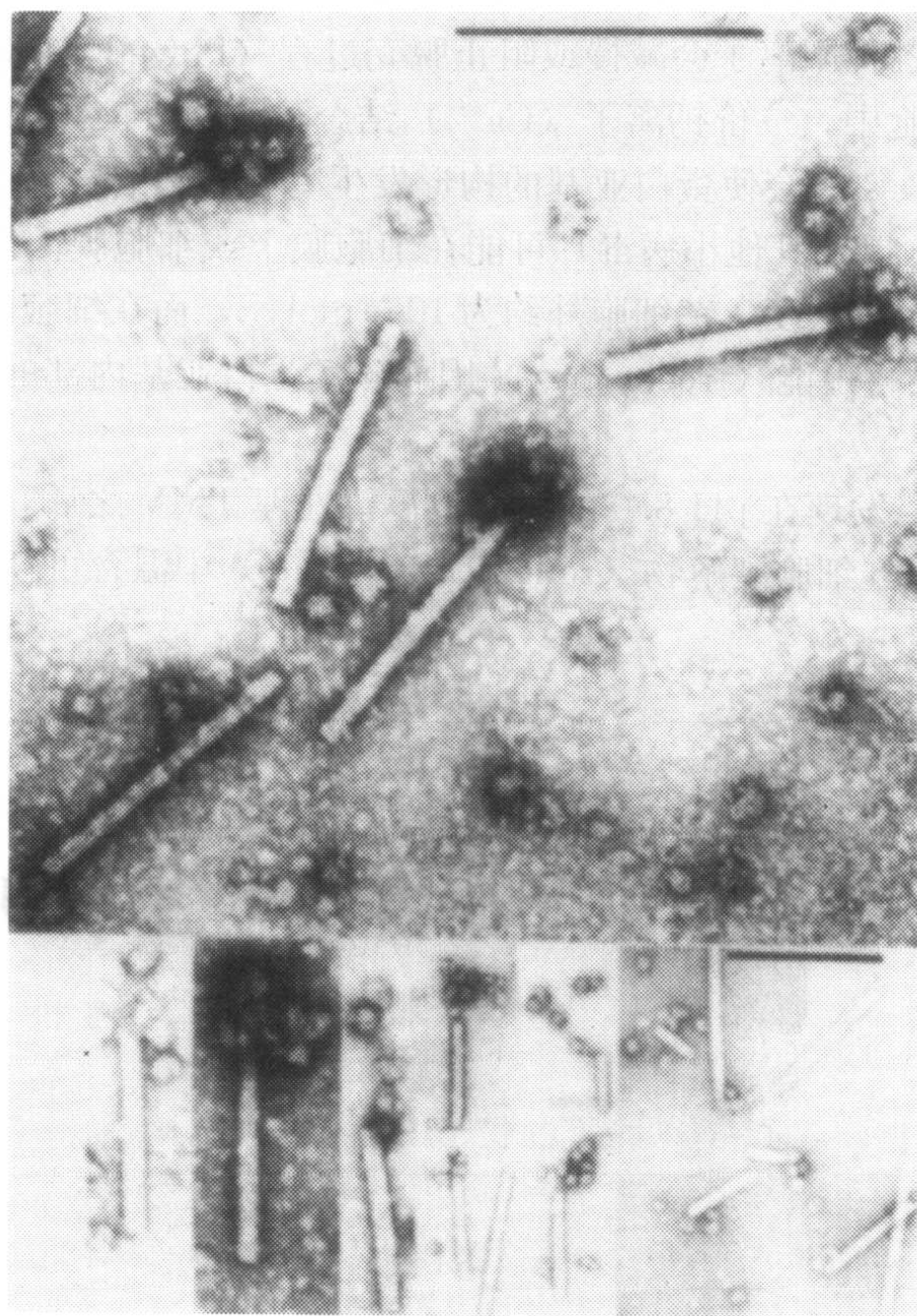


图7.5　脱壳体复合物。在电子显微镜下观察由 TMV 粒体起始的体外翻译的产物。在某些粒体的一端结合着据认为是核糖体的结构。这些复合物据认为是共翻译解装配过程的中间物。经允许，引自 Wilson (1984)。

1984b)。在 *E. coli* 的体外蛋白质合成系统中，pH 8.0 处理过的 TMV 病毒能够合成大量的 126 kDa 蛋白质；然而，同样条件下 TMV RNA 却只能产生 50 kDa 或更小的多肽，以及大量与外壳蛋白亚基大小相当的多肽（Wilson，1986）。用 TMV 病毒粒体或 TMV 的 RNA 微注射爪蟾（*Xeno pus*）卵母细胞（oocyte），与用 TMV 的 RNA 微注射相比，产生了至少等量的 126 kDa 蛋白质（Ph. C. Turner *et al.*，1987）。这个实验看来可以排除纤维素细胞壁在 TMV 于叶片内脱壳过程中的特异性作用。它是否也可以排除质膜（plasma membrane）参与其过程还不确定，这取决于（有可能经细胞膜进入卵母细胞的）注射针外部的污染性完整病毒粒体是否在进入细胞前已经脱壳。

在体外用 SDS 处理 TMV 15 s，即可暴露出基因组核酸的 5′端至第一个 AUG 密码子下游的一段核苷酸序列；但是在此后用 SDS 处理 15 min，5′核苷酸不再继续暴露出来。把 SDS 处理过的 TMV 杆状粒体在小麦胚提取物或者兔网织红细胞裂解物温育后，导致约 20%的病毒粒体上结合一两个核糖体（Mundry *et al.*，1990）。结构预测表明暴露出来的 5′端至第一段 AUG 密码子的序列是以展开的单链构型而存在的（参见第Ⅴ节

C. 5)，这样的构型有助于与核糖体的结合。

3. 原生质体实验

为了得到合理的原生质体侵染比例，必须对病毒和（或）原生质体采取某种处理方式（参见第 8 章第Ⅲ节 A. 5)。电镜技术已用于研究病毒进入的过程，结果表明，多聚 L-鸟氨酸（poly-L-ornithine）能通过破坏质膜（plasmalemma）（Burgess *et al.*，1973）或刺激内吞活性（Takebe *et al.*，1975）等作用，促使 TMV 进入原生质体。在接种 1 h 之后，能吸附到原生质体上的 TMV 接种体脱壳的比例的估计值为 5%（Wyatt and Shaw，1975）到约 30%（Zhuravlev *et al.*，1975）不等，但是完全脱壳的 TMV RNA 的比例还不能确定。鉴于细胞处于异常状态，尤其是悬浮培养基的性质，使机械接种后病毒在原生质体中的表现与在叶片中的侵染过程是否一样，值得我们慎重考虑。

4. 共翻译解装配

Wilson 与其同事最初的实验表明体外的共翻译解装配（co-translational disassembly *in vitro*）可能是病毒在侵染过程中的关键步骤，是一个非常有说服力的机制。为了证明在体内是否存在同样的机制，Shaw 等（1986）从接种了 TMV 的烟草叶片的表皮细胞中提取了样品，并鉴定了一些分子，表明 80S 核糖体以与体外研究中了解的共翻译解装配的方式从 5′端沿着 RNA 移动（参见本节 B. 2 部分）。具有一定比例的脱壳体的翻译复合体已经从刚接种过 TMV 的烟草叶片表皮细胞中分离出来（Plaskitt *et al.*，1987）。其后的原生质体实验为我们展示了一个更加完整的概貌（Wu *et al.*，1994；Wu and Shaw，1996；Wu and Shaw，1997）。

共翻译解装配中的第一个事件为病毒粒体的结构必须松弛以便使核糖体可以接近 RNA 的 5′端。在体外用 SDS 或弱碱处理后，具有 68 nt 的 5′前导序列（缺少鸟苷酸残基），与外壳蛋白亚基的结合能力比基因组的其他区域弱（Mundry *et al.*，1991）。如第 5 章（第Ⅲ节 B. 5 部分）所述，TMV 粒体的稳定主要是靠羧酸酯的互作（carboxylate interaction）［在邻近的亚基之间存在着两个羧基-羧酸酯键（carboxyl-carboxylate bond）］以及羧酸酯与 RNA 的互作（carboxylate-RNA interaction）。在略微碱性的 pH 环境中，这些羧酸酯被质子化（protonated）导致静电排斥（electrostatic repulsion）。对这些键的诱变实验结果表明情况可能比最初预想的更加复杂。尽管如此，这些课题组还是向大家提供了有关病毒解装配的关键控制机制（Culver *et al.*，1995；Lu *et al.*，1996；1998；Wang *et al.*，1998）。

起始翻译后，核糖体沿着 TMV 的 RNA 翻译 5′端的可读框，产生 126/183 kDa 的复制酶，同时使外壳蛋白亚基解离。当核糖体到达 126/183 kDa 可读框的终止密码子时随即脱离。但是，病毒粒体的 3′部分是如何解装配的呢？Wilson（1985）提出，复制酶在以 3′→5′方向合成复制中间体的负链时可能完成了这项任务。Wu 和 Shaw（1997）的实验支持了 Wilson 的提法，因为他们获得了从 3′端开始的共复制解装配（co-replicational disassembly）的证据。他们证明，在 126 kDa 和 183 kDa 的 ORF 中含有突变的粒体在电激过的原生质体中不能发生 3′→5′方向的解装配，但是这种解装配能够通过野生型 TMV 的反式互补（complemented *in trans*）而完成。

综上所述，TMV是以双向的方式脱壳的：首先，利用共翻译解装配机制以5′→3′方向合成复制酶，然后复制酶又以3′→5′方向使粒体的其他部分解装配，这表明解装配与复制是连锁的过程。该过程发生迅速，整个衣壳的脱壳在20 min之内即可完成（Wu *et al.*，1994；Wu and Shaw，1996）（图7.6）。

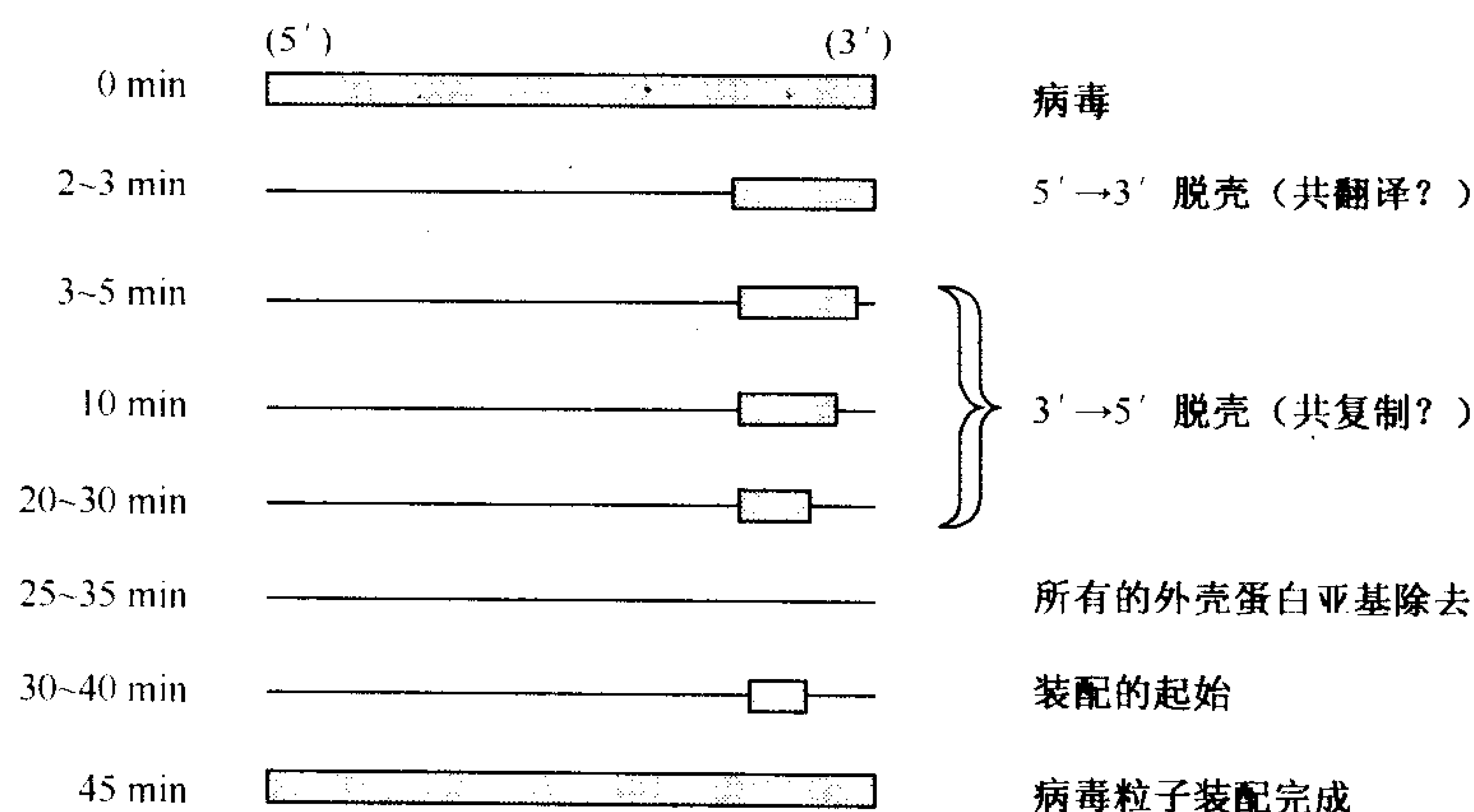


图7.6 TMV粒体在体内的双向解装配。在接种原生质体的最初2～3 min内，外壳蛋白亚基以5′→3′方向从约75%的病毒RNA上脱离。该RNA 3′端在其后不久开始脱壳并且自3′→5′反向使蛋白亚基完全地脱离。承蒙版权所有者（The National Academy of Sciences）惠允，引自Wu等（1994）。

C. 雀麦花叶病毒属病毒的脱壳过程

雀麦花叶病毒属病毒（bromoviruses）在pH高于7的环境中，病毒的等轴状粒体发生膨胀（参见第5章第Ⅵ节4.b）并可以发生共翻译解装配过程（Brisco *et al.*，1986a）。在这些体外实验中，膨胀的BMV和CCMV粒体与小麦胚提取物混合后就能得到翻译产物。但是，用未膨胀的病毒粒体就不能进行翻译得到蛋白质产物，因为麦胚提取物在pH低于7的条件下未能翻译mRNA。上述实验表明这个属的病毒与SBMV（参见本节D部分）相似，受pH和Ca^{2+}调节的膨胀过程是雀麦花叶病毒属病毒粒体脱壳的必要条件。蔗糖和氯化铯密度梯度离心实验结果表明一个病毒粒体与多至4个核糖体能形成一个病毒-核糖体复合体（Roenhorst *et al.*，1989）。

根据在碱性条件不能膨胀的CCMV突变体来做的实验，Albert等（1997）发现膨胀不一定是共翻译解装配的必要条件。他们指出使病毒RNA进入翻译系统依赖于pH的病毒粒体的结构转换而不是依赖于膨胀状态。他们提出的这个模型与脊椎动物和昆虫病毒的一些模型是很相似的，认为病毒粒体的五聚体壳粒（pentameric capsomere）中5个亚基的N端能够经过一个主要的结构转换从病毒粒体的内侧转到病毒的外侧。转换的结果能够提供给RNA一个通道，使翻译装置能接触到RNA起始翻译（Albert *et al.*，1997）。然而，病毒核酸的5′端必须首先被释放出来，这说明RNA的5′端与五聚体的壳粒密切相连。

D. 南方菜豆花叶病毒（SBMV）的脱壳过程

在与上述雀麦花叶病毒属病毒相同的一些实验中，Brisco 等（1986a）证明膨胀的 SBMV 粒体也能发生共翻译解装配。因为 pH 和 Ca^{2+} 调节的相互作用控制此病毒的稳定性，这些条件同样可以控制翻译系统在所需的碱性 pH 环境中的膨胀过程。当膨胀的 SBMV 粒体在含有放射性同位素 ^{35}S 标记的甲硫氨酸的麦胚提取物一起温育时，蔗糖密度梯度分析表明 80S 的核糖体能吸附到完整或者近乎完整的病毒粒体上（Shield *et al.*，1989）。数据表明病毒 RNA 的翻译在从病毒粒体上完全释放出来之前就已经开始了。现在还不能确定解装配所涉及的 RNA 释放是否像上述 CCMV 的实验那样须通过五聚体壳粒的“洞”出来。

E. 芜菁黄花叶病毒（TYMV）的脱壳

TYMV 在体外翻译装置中不能像 SBMV 那样能进行共翻译解装配（Brisco *et al.*，1986a）。体外实验表明，在各种非生理条件下，RNA 都能从尚未解体的 TYMV 粒体的蛋白外壳中逃逸出来。因此，在 pH 11.5 和 1 mol/L 的 KCl 溶液中，RNA 能迅速地从与 5～8 个蛋白亚基组成的簇一起从衣壳中释放出来（Keeling and Mattews，1982）。RNA 释放出来以后，通过冷冻和融化等过程，在蛋白外壳上留下了对应于 5～7 个亚基的“洞”（Katouzian-Safadi and Berthet-Colominas，1983）。将 TYMV 在 pH 7.4 条件下用 3%～7%的正丁醇处理后，会迅速释放 RNA 以及以单体的形式存在的 5 个或 6 个蛋白亚基（Matthews，1991）。

Kurtz-Fritsch 和 Kurtz（1972）发现从接种 TYNV 的大白菜叶片回收的病毒里面，20 min 后大概有 2%发生脱壳。并且，在 RNA 释放后很快形成了空壳和低分子质量蛋白质。Mattews 和 Witz（1985）证实了上面的结果。他们的实验结果表明在 45 s 内回收的接种体中很大一部分是处于脱壳状态；并且整个脱壳过程只需要 2 min。这些病毒的 80%～90%的脱壳过程在植物的表皮细胞里发生。每个表皮细胞里面大约有 10^6 个粒体脱壳（参见第 12 章第Ⅱ节 D 和 E 部分）。这些过程会产生已失去五六个蛋白亚基的空壳，并产生低分子质量蛋白质。从所用的高浓度接种体中，推测所释放出来的 RNA 大多数在表皮细胞里一定受到了钝化。使用硅藻土（celite）作为一种摩擦材料（abrasive），以说明已提出的 TMV 的侵入机制（图 7.3）涉及大量的病毒粒体进入每个细胞。前述脱壳过程不只限于 TYMV 的已知寄主。

F. 讨论

病毒结构的稳定性有正反两方面的作用：病毒粒体必须足够稳定以便在被转运出寄主时保护病毒的基因组；而在寄主中则需要结构松弛足以使基因组接触到细胞环境（cellular milieu）以便开始第一阶段的复制。至少对某些具有正义 RNA 基因组的病毒来说，共翻译解装配的过程回答了这个问题。TMV 的共翻译脱壳和共复制脱壳是适用于杆状病毒的一个优雅、巧妙的过程。然而，对其他一些较长的杆状病毒来说，它们的解体可能不采用这一过程。如果装配的起点位于 RNA 的 5′端或 5′端附近（参见第 5 章第Ⅳ节 B）（如 TMV 这种情况），就可能会成为核糖体移动的障碍。对其他类型的病毒

基因组来说，其侵染初级阶段的要求不同于正义 ssRNA 病毒。

双链 RNA 病毒或者负义 ssRNA 病毒必须通过转录产生 mRNA。所以，这些病毒粒体中携带着依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶，并且转录是一个早期的过程。

尚不清楚转录过程是否在病毒粒体内部进行（可能是在一个松弛的结构中），或者病毒的基因组是否被释放到寄主细胞里。然而，这个过程很可能是在一个不受细胞中核酸酶降解的保护性环境中进行的，并且与 mRNA 的翻译相连锁。

对等轴型病毒而言，可能在体内（*in vivo*）发生某种形式的共翻译解装配，粒体变得膨胀或者一直保持膨胀（如 AMV）。对一些更加稳定的等轴体病毒来说，是否采用从去稳定的五聚体结构（destabilized pentamer structure）中释放出 RNA 的策略还需要进一步的证明。

花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）病毒的双链 DNA 病毒基因组必须转运到寄主的核内，利用寄主的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶（DNA-dependent RNA polymerase）转录产生 mRNA（参见第Ⅳ节 D 部分）。

CaMV 的外壳蛋白中有一个核定位信号（nuclear localization signal），可能会指导病毒粒体进入细胞核中（Leclerc *et al.*，1999）。花椰菜花叶病毒属（*Caulimovirus*）病毒和杆状 DNA 病毒属（*Badnavirus*）病毒的粒体特别稳定，它们能抵抗酚的降解（Hull and Covey，1983；Bao and Hull，1994）。目前人们还不清楚它们是如何解体的。

双生病毒科（*Geminiviridae*）内的具有 ssDNA 基因组的病毒也要转运至寄主细胞核中加以复制，随后进行转录产生 mRNA。如第 9 章第Ⅱ节 C 部分所述，这些核定位信号可以被双生病毒的某些蛋白质中识别。但是，人们对这些病毒粒体的脱壳过程还一无所知。

第Ⅲ节　病毒基因组的表达

基因组策略是一个很有用，但又相当模糊的术语（Wolstenholme and O'Connor，1971；Matthews，1991）。这可以包括有关病毒的结构、复制以及生态学的几乎每一个方面。

该术语已经被用于以下几个方面：①基因组的结构（DNA 或 RNA，双链还是单链，正义还是负义等）。②核酸是否独自具有侵染性。③病毒基因组复制过程中的酶学（enzymology）的综合特性。例如，病毒粒体是否带有核酸聚合酶以及病毒自身编码的有关核酸代谢的任何其他酶类。④病毒基因组信息的转录和翻译成病毒蛋白的总体模式（不是这个过程的详细的分子生物学）。然而，在本章中，将用这个术语描述植物病毒的组群（科、属）之间在从侵染循环的 mRNA 阶段参与翻译病毒基因组信息的过程中所采取的各种策略。同时，一些选择压可能已参与到这种病毒策略的进化过程中。在描述完基因组表达策略后，我们再陆续讨论 mRNA 的合成方式、选择压以及病毒克服这些限制的方式。

使我们了解基因组策略的各种事件的实际发生顺序，对于不同的病毒有很大的差异。这是由于在某个特定学科趋向发展的过程中存在的相当偶然的方式。现在举两个例子来进行说明：

（1）在 TMV 的基因产物的所有 4 个确定的蛋白质中，三个非结构蛋白在该病毒的基因组核苷酸序列测定之前就已经被鉴定。

（2）然而，另一个极端是，虽然一些病毒的核苷酸全序列已经测定，但是 7 个潜在的基因产物中只有一两个产物被鉴定（characterized），它们通常为病毒粒体中存在的蛋白质。

本章将以（比已经应用于许多病毒的实际顺序）更加具有逻辑性的顺序对所涉及的各种方法加以介绍。首先，我们必须了解基因组的结构特点，特别是基因组片段的数目、基因组中各个可读框的排列、这些可读框的推断的氨基酸序列以及任何调节和识别的核苷酸序列的位置等。在第二阶段，我们必须通过体外（*in vitro*）和体内（*in vivo*）实验确定那些有实际功能的可读框。我们需要通过直接研究从细胞中分离出来的病毒蛋白质，或用可揭示各种生物活性的经典遗传学研究方法来鉴定病毒基因的功能。最后，我们需要把这些基因的活性特点与有功能的特定可读框联系起来。在这方面，反向遗传学（reverse genetics）技术可以发挥很重要的作用。反向遗传学的主要过程是把在基因组中预先选定的任何位置进行突变（碱基变化、碱基插入或缺失）；然后根据突变对基因产物及其生物学功能（以前用传统方法无法识别的功能）的影响来研究该突变的后果。

A. 病毒基因组的结构

在确定病毒基因组的结构时有几个步骤。起始材料（starting material）几乎总是从纯化的病毒中分离出的核酸。

1. 核酸的种类

无论核酸是单链还是双链、DNA 还是 RNA、线状还是环状，它们都能用本书第 4 章提到的各种化学、物理以及酶催化程序加以确定。

2. 基因组片段的数目

如果病毒粒体里面含有多分体基因组的数个片段的大小或密度有明显区别时，可以通过密度梯度离心来进行分部分离（fractionated），然后从分部中分离出各个核酸片段；也可以通过密度梯度和凝胶电泳分开不同大小的核酸片段。如果双分体基因组的两个片段的大小非常接近，如一些双生病毒，则只能通过估计序列复杂性的杂交实验来证明两个不同基因组片段的存在。然而，若欲得到基因组由两个基因片段组成的正式证据，最好是分别克隆两个片段的全长序列，然后分别证明两个片段都是侵染性所必需的（如双生病毒，Hamilton *et al.*，1983）。

3. 末端结构

如第 4 章第Ⅲ节 A. 5 所述，用化学和酶学方法能鉴定出线性核酸的 5′端和 3′端结构的特性。

4. 核苷酸序列

我们对病毒基因组的全长核苷酸序列的了解程度对理解整个基因组的结构和策略是至关重要的。在许多出版物和实验室手册上都能查到关于这方面所用的方法。

5. 可读框

借助于合适的计算机软件，我们分别分析基因组的正链和负链的各 3 个不同的读框，寻找出可能存在的可读框（ORF）。将所有这些可读框列成表。图 7.7 所示的是一种芜菁黄花叶病毒属病毒（tymoviruses）的所有可读框。

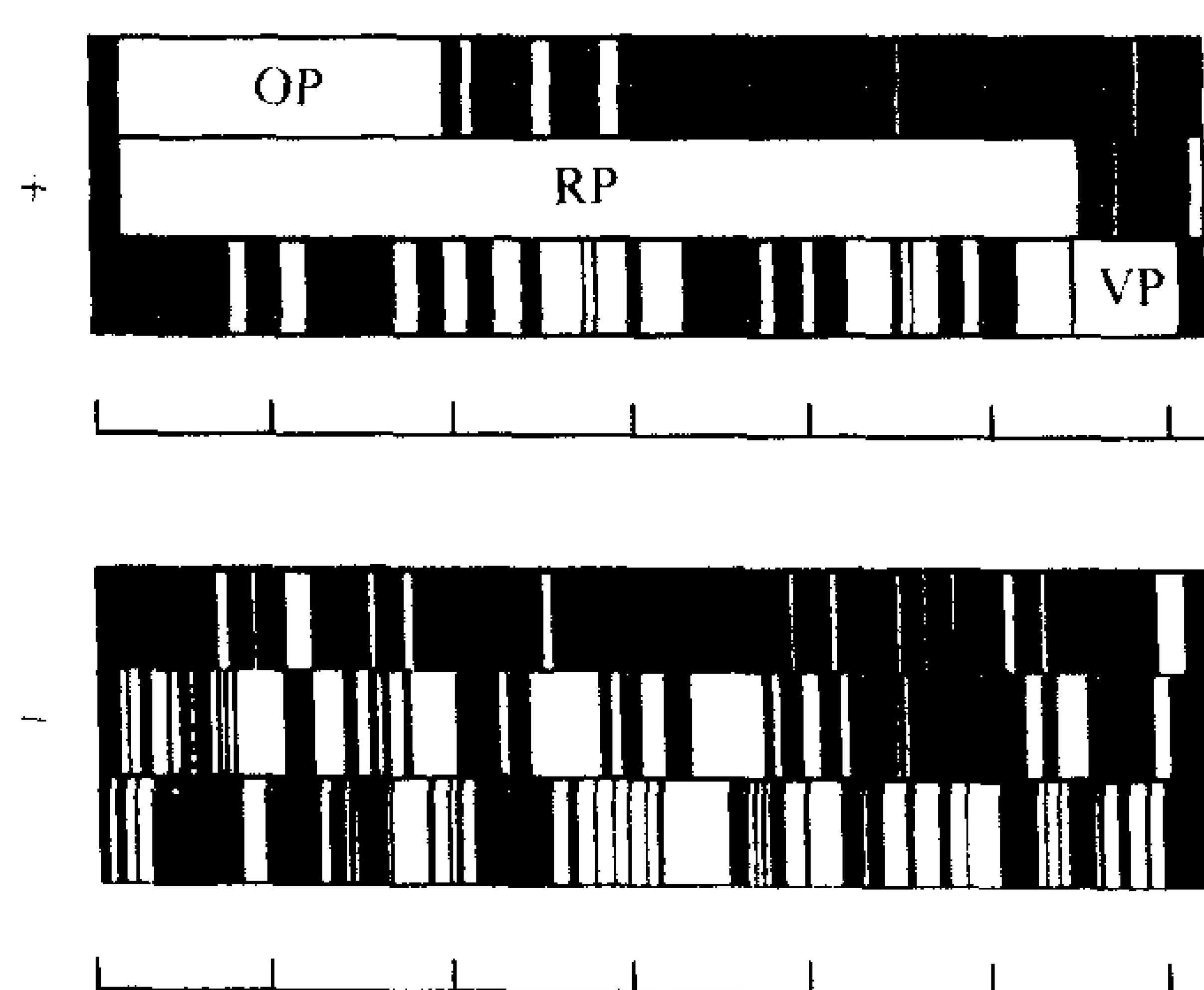


图7.7 芜菁黄花叶病毒属芒柄花黄花叶病毒（OYMV）基因组 RNA 的正链与负链 RNA 上3个相位（phase）的三联体密码子图。白框表示由 AUG 起始，以 UGA、UAG 或 UAA 终止的所有可读框（ORF）。3 个明显较大的（重要的）ORF 分别被标示为 OP（重叠蛋白）、RP（复制酶蛋白）和 VP（外壳蛋白）。经允许，引自 Ding 等（1989）。

图 7.7 表明，计算机软件分析可以揭示出许多可读框。在这些可读框中，那些编码的多肽小于 7～10 kDa 的，或者存在不可能的氨基酸组成的多肽等都不用做进一步的分析。然而，在几个病毒中都存在的、具有序列相似性的小可读框可能说明它们是具有某种功能的。例如，在马铃薯 X 病毒属病毒和香石竹潜隐病毒属病毒中存在的一些 7～9 kDa的 ORF 就具有功能。

在一些一般认为属于正链基因组的病毒中，其负链也能含有一些 ORF，可能编码 100 个或更多氨基酸的潜在蛋白质。例如，CPMV 的RNA 2（Lomonossoff and Shanks，1983）、TMV（Goelet *et al.*，1982）、AMV 的 RNA 1 和 RNA 2（Cornelissen *et al.*，1983a，b）、PapMV（AbouHaidar，1988）等都存在此类情况。至今还没有证据表明这些 ORF 是否有意义。然而，有功能的可读框存在于负链上也不是没有道理的。已知这些有功能的可读框存在于双生病毒科、番茄斑萎病毒属和纤细病毒属病毒中（参见第 6 章的第Ⅴ节和第Ⅶ节）。

病毒的可读框不一定用常规的 AUG 起始密码子。例如，RTBV 的 ORF Ⅰ的起始密码子是 AUU（Fütterer *et al.*，1996），SBWMV 编码 CP 的可读框的起始密码子是 CUG（Shirako，1998）。这种现象使如何定义可读框出现了一定的难度。通常情况下，可读框是以 AUG 密码子开始，以 3 个终止密码子之一结束。如果非 AUG 起始密码子的存在广泛到超乎想像的程度并且没有终止密码子，可读框将会变大。

6. 氨基酸序列

由可读框编码的潜在多肽的氨基酸序列和分子质量可以由其核苷酸序列和遗传密码来确定。

7. 调节信号

基因组的各个部分，尤其是5′端和3′端的非编码序列，可能含有调节和识别信号。这部分内容将在第Ⅴ节C部分讲到。调节序列也可能存在于编码序列中。

8. mRNA

DNA病毒在表达的过程中必须转录出一条或多条mRNA。我们必须鉴定从染病的组织里面分离的核酸并将其与基因组DNA序列比较以便得知mRNA的序列。许多具有正义ssRNA基因组的病毒编码的一些ORF只能从亚基因组RNA上翻译（参见第Ⅴ节B.2部分讨论）。在阐明基因组策略时，这些情况也必须考虑在内。

从病毒侵染的组织中或者纯化的病毒中，可能存在着亚基因组RNA片段。这些亚基因组能在体外翻译成不同大小的多肽，但是这些多肽与基因组RNA上的可读框相位不相符合。例如，Higgins等（1978）在分离自TYMV的病毒样品的核酸中发现8种不同长度的RNA分子。Mellema等（1979）发现这8种RNA分子中的5种与在网织红细胞系统合成的几个多肽相对应。并且，他们发现这些RNA与亚基因组RNA的全长翻译产物相互重叠并且具有相同的氨基末端。因此Mellema等断定这些RNA分子在其5′端附近具有共同的翻译起始位点。

从TMV侵染的组织中提取的TMV RNA的体外翻译产生了一系列分子质量大小分别为45 kDa、55 kDa、80 kDa和95 kDa的翻译产物（Goelet and Karn，1982）。这些蛋白质有共同的C端和不同的N端。为此，Goelet和Karn提出一个假说：首先由病毒RNA复制出一套不完整的负链片段，然后再由这些片段转录成一系列非全长的mRNA。由于这些N端和C端的蛋白质家族在病毒复制的过程中不发挥作用，我们对其将不再做进一步的讨论。

因此，可能难以区分一种亚基因组大小的病毒RNA片段是有功能的mRNA，还是基因组RNA部分降解的产物或部分合成的片段。一个鉴定方法是首先分离出有活性的多核糖体（polyribosome）部分，然后再从中得到认定的mRNA。这些RNA片段可以用凝胶电泳分部分离，再用适当的杂交探针或PCR鉴定病毒特异性的序列。

真正的病毒亚基因组mRNA经常和基因组RNA一起被包装在病毒粒体中。我们能从纯化的病毒样品中分离并确定这些亚基因RNA的特点。如果基因组核酸的序列已知，可以用两个不同的手段来精确地定位一个可能的亚基因组RNA的5′端。在S1核酸酶保护方法（S1 nuclease protection procedure）中，用包括亚基因组RNA的5′区域的互补DNA序列与mRNA杂交。未杂交的单链线状的区域被S1核酸酶去除。然后把被mRNA保护的DNA片段测序。第二种方法是引物延伸法（primer extension）。用一个合适的单链引物与mRNA退火互补结合。然后利用反转录延伸引物，合成与mRNA互补的DNA片段，直到mRNA的5′端，随后测定所合成的DNA分子的序列。Carrington和Morris（1986）用这两种方法确定了CarMV的两个亚基因组RNA的5′端。序列测定表明一个确定的单一末端核苷酸而非数种不同的核苷酸是一个良好的指标，即所研究的亚基因组RNA是一种确定的分子而不是多个异源分子（Sulzinski *et al.*，1985）。

B. 确定有功能的可读框

通过核苷酸序列确定的一些可读框在体内能编码蛋白质，而其他可读框则不能翻译表达。只有利用病毒的 mRNA 进行体外翻译研究，并且从受侵染细胞中发现相关的蛋白质，才能明确地鉴定有功能的可读框。

1. mRNA 的体外翻译

在源自于大肠杆菌的体外原核表达体系（prokaryotic *in vitro* system）里，STNV 的单顺反子 RNA 可以忠实地翻译表达（Lundquist *et al.*，1972）。然而，一些其他的植物病毒 RNA 的表达结果却很难进行合理地解释。三种体外源自于真核生物的表达体系已经证明对这些植物病毒 RNA 是有用的。现将这三种体系的方法简述如下：

（1）利用密度梯度离心和（或）聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）可以得到高度纯化的目的 RNA。对于那些在体外蛋白质合成体系里粒体肿胀的病毒而言，这些与病毒相关的 RNA 有可能像 mRNA 一样有效地翻译（Brisco *et al.*，1986a）。此外，也可以由克隆的病毒 cDNA 或 DNA 在体外转录出 RNA。

（2）然后将这些 RNA 加入到含有各种氨基酸的蛋白质合成系统中，并对其中的一种或多种氨基酸进行放射性标记（radioactively labeled）。

（3）反应终止后，将多肽产物和已知大小的分子质量标记一起进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳以加以分离。

（4）蛋白质产物可以通过结合的放射性标记定位于凝胶上。

这三个体系是：

（a）兔网织红细胞裂解物体系。将来自患贫血症的兔子血液中的细胞在水里裂解，然后以 12000 *g* 离心 10 min 得到的上清液即可使用。由于这个反应体系几乎没有 RNA 酶活性，因此效果很好。图 7.8 表明了该体系的用法。

（b）小麦胚体系。这个体系的主要组分是去除了线粒体的小麦胚提取物上清液，在有适当的标记存在的情况下加入病毒的 RNA。这个体系可能含有一些源自于动物的体系所没有的植物因子。

（c）蟾蜍卵母细胞（toad oocyte）体系。严格来讲，这个体系不算是体外翻译系统。基本过程就是把病毒 mRNA 注射到蟾蜍（*Xenopus* 或 *Bufo*）的卵母细胞里，然后将其在标记的培养基上温育。

Jagus（1987a，b）报道了这些方法的具体操作过程。前两种体系可以从一些公司得到成套的试剂。当病毒基因组 RNA 在无细胞体系中翻译时，除了得到根据基因组 RNA 中的 ORF 预期的蛋白质产物之外，还经常发现数种少量的病毒特异性多肽。在体内，这些多肽可能没有任何功能。

在体外可能是通过下述机制中的一种或多种产生这些多肽：①内切核酸酶在基因组 RNA 的特殊位点切割；②在温育期间较长的蛋白质产物受到蛋白酶的切割；③有义密码子错读为终止密码子；④基因组在体外条件下形成的二级结构可以阻止一定比例的核糖体沿 RNA 移动，造成过早终止。

例如，在兔网织红细胞裂解物体系翻译的 TMV RNA 产生的分子质量小于 11 kDa

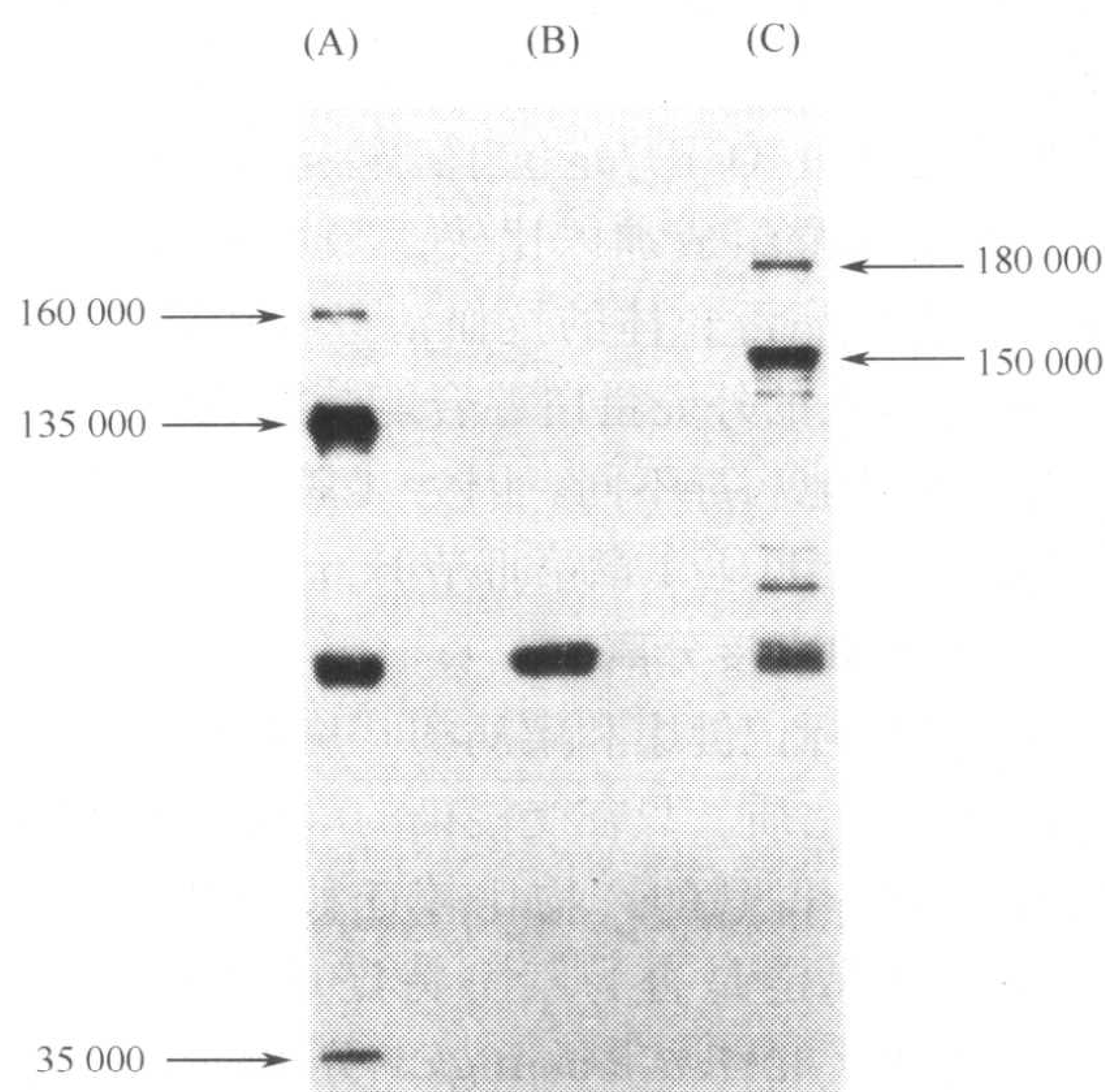


图7.8 植物病毒 RNA 在兔网织红细胞裂解物系统中的体外翻译。多肽产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并通过凝胶的放射自显影定位。(A)利用 TMV RNA 作为信使 RNA 翻译的产物;(B)未加入 RNA 的对照;(C)利用 TYMV RNA 翻译的产物。没有标记的较小的多肽可能是病毒 mRNA 的不完全转录物或者由内源 mRNA 引起的。值得注意的是,两种所用的病毒 RNA 均未翻译出与病毒外壳蛋白大小(17.5 kDa 或20 kDa)相同的蛋白质。经允许,引自 Briand (1978)。

的不同的多肽都是这些情况造成的（Wilson and Glover，1983)。同样地，TMV 的 I_2 亚基因组 RNA 在体外翻译时除了产生 30 kDa 左右的蛋白质外，还合成了一系列其他的蛋白质，但只有 30 kDa 蛋白质可以在体内检测到（Ooshika *et al.*，1984)。对这些多肽在病毒复制相关的部分不再做进一步的讨论。

什么标准可用以“优化”体外翻译的条件呢？掺入的总放射性的测定并不能提供足够的信息量，而聚丙烯酰胺凝胶上分开的每一蛋白质条带产生的放射性的测定值更加有用。条件优化的一般目标是：①多肽的表达种类最多；②多肽的种类最少；③产生最长的多肽；④某一特定已知基因产物的表达量最大。很明显，为了从对体外产生的多肽的研究获得精确的基因组编码基因的明确定位（definitive mapping)，我们还必须了解这些病毒在体内环境的多肽合成情况。

2. 鉴定体内有功能的可读框的方法

除了一些在病毒粒体内存在的病毒蛋白之外，可能很难在植物体内检测到病毒编码的其他蛋白质，尤其是那些含量很低或只在病毒复制循环的某个特定阶段瞬时存在的蛋白质。然而，现在有很多方法能用于检测体内的病毒编码的蛋白质，并且可以与已测序的病毒基因组的可读框（ORF）相对应。特别是从基因组序列中可精确估计所编码的蛋白质的大小和氨基酸组成。了解根据 ORF 的序列推断的氨基酸组成有助于我们通过某个产物的部分氨基酸序列或抗体来鉴定体内的该产物。相关抗体可以用原核（如大肠

杆菌）表达的部分产物或与推断的氨基酸序列人工合成的多肽片段制备。

a. 病毒中存在的蛋白质

用以下标准很容易将外壳蛋白（CP）定位于某特定可读框上：①将CP的氨基酸组成与通过可读框计算出来的氨基酸组成加以比较；②外壳蛋白的部分或全长氨基酸序列；③将得到的体外翻译产物与病毒粒体的抗血清进行血清学反应；④对一些病毒如TMV而言，体外翻译产物与真正的外壳蛋白混合能装配成病毒粒体。一些病毒如弹状病毒和呼肠病毒科病毒可能与其他病毒不同，因为其基因组中的可读框对应的多种基因产物存在于纯化的病毒样品中（参见第4章第Ⅲ节B.6.d部分与第6章第Ⅶ节A部分）。

b. 从受侵染的组织或原生质体中直接分离

用一种或多种放射性氨基酸标记健康和染病的叶片或原生质体。用合适的方法分离细胞提取物并用凝胶电泳分离蛋白质。只在受侵染的（而非健康的）细胞样品中出现蛋白质条带，可以通过与体外翻译得到的产物比较迁移率和胰蛋白酶降解的肽段带型（pattern of tryptic peptide）来确定是否为某一特定可读框的产物（Bujarski *et al.*，1982）。用合适的体内标记方法（*in vivo* labeling），分离的蛋白质的部分标记氨基酸序列可能有助于精确定位其编码序列在基因组中的位置（Wellink *et al.*，1986）。如果受到一些病毒如马铃薯Y病毒属病毒（potyviruses）的侵染时，在受侵染的细胞中会积累大量的病毒编码的非结构蛋白，这有利于每种蛋白质在基因组中的定位。

c. 血清学反应

血清学反应是一套很好的方法，利于识别在体内产生的、病毒编码的蛋白质，并且利于将其与基因组中的适宜的ORF相对应。

i. 抗合成多肽的抗血清

人工合成的多肽是根据可读框预测的部分氨基酸序列制备的。根据人工合成的多肽制备的抗血清可以用于从健康或受侵染的组织或原生质体中检测预期的蛋白质。例如，Kibertis等（1983）合成了TMV基因组中的ORF编码的一个30 kDa蛋白质的C端11个氨基酸的多肽，随后他们就用上述方法证明对应于这个ORF的多肽能在受侵染的原生质体中合成。

ii. 体外翻译产物的抗血清

如果一个mRNA能翻译产生与某特定ORF或基因组片段相符的多肽产物，这种体外产物（多肽）的抗血清可以用于从受侵染的细胞或组织的提取物中鉴定同一种蛋白质。例如，烟草叶片中的AMV的RNA片段编码的非结构蛋白就可以用这种方法鉴定出来。这些抗血清一般与非常敏感的免疫印迹法（immunoblotting procedure）一起应用。

iii. 重组蛋白质的抗血清

重组蛋白质可以通过克隆基因的RNA转录物的体外翻译获得，也可以在各种原核（*E. coli*）系统的表达中得到。在后一种方法中，在蛋白质上加一个“标签”（tag）使其易于纯化。用重组蛋白质制备的抗血清可以被用于从罹病植物的提取液中检测相应的蛋白质。弹状病毒SYNV的核衣壳蛋白基因的位置就是利用第一种方法找到的（Zuidema *et al.*，1987）。针对RTSV的多聚蛋白的聚合酶和蛋白酶的抗血清就是利用*E. coli*系统表达产物制备的（Thole and Hull，1998）。将RTSV cDNA插入到一种大

肠杆菌表达载体中，表达出与谷胱甘肽S-转移酶（glutathione S-transferase）相连的融合蛋白，最后用谷胱甘肽-琼脂糖珠（glutathione-agarose bead）吸附来纯化该蛋白质。

iv. 免疫金标记法

制备与基因组核酸中某个ORF的一部分相对应的合成多肽并获得其抗体，然后用金标记该抗体以便探测受侵染细胞中根据序列推定的基因产物（putative gene product）的存在。TMV的30 kDa的基因产物就是用这种方法检测到的（Tomenius *et al.*，1987）。CaMV ORF Ⅰ在*E. coli*中表达的产物的抗体用免疫金标记（immunogold labeling）法表明该蛋白质在染病叶片中得到了表达（Linstead *et al.*，1988）。

d. 与其他病毒中已知功能基因的比较

如果大小、在基因组中的位置和核苷酸序列与已知的功能基因有很高的相似性，则说明该可读框很可能在体内编码功能蛋白质。通过在计算机数据库中搜索经常可得到这类结果。例如，编码潜在的聚合酶（依赖于RNA的RNA聚合酶和反转录酶）的可读框就可以通过几个特征性的模体来鉴定（参见第8章第Ⅳ节B.1部分和第Ⅶ节A部分）。

e. 具有典型特征的亚基因组RNA的编码产物

有时，一种病毒的亚基因组RNA（sgRNA）已得到充分的鉴定，但是检测不到体内存在的蛋白质产物。例如，TMV的I_1 sgRNA被认为是有功能的mRNA，理由有两条：①它位于从感染细胞中得到的多聚核糖体组分中；②它有一个精确确定的5′端（Sulzinski *et al.*，1985）。因此，有理由认为这个亚基因组RNA的5′端的可读框在体内应该是有功能的。

f. RNA中适当调节信号的存在

起始蛋白质合成的三联体密码子AUG的附近存在着一个特征性的序列（参见第Ⅴ节A部分）。AUG的上游可能存在着特定的核糖体识别信号。具有这些序列的可读框大都是有功能的。

g. 密码子使用

密码子的使用频率有时也能够预示一个基因组中的核苷酸序列中的可读框能否产生有功能的蛋白质（Morch *et al.*，1988）。然而，对RTBV的密码子使用分析表明RTBV使用许多稀有密码子（R. Hull，未发表），因此，这个特征不能作为主要的衡量标准。

h. 呼肠病毒科病毒

在确定有功能的可读框时，呼肠病毒科病毒（reoviruses）是一个特例。该病毒的每一个双链基因组片段均可在体外转录产生一个mRNA，该mRNA经翻译产生一个蛋白质产物（Nuss and Peterson，1981）。因此，曾认为其每一个基因组片段就是一个功能性的可读框（参见第6章第Ⅵ节A部分）。

C. 鉴定病毒基因的活性

在病毒基因组的核苷酸序列信息确定之前以及在体外翻译系统建立之前，曾有两种方法可以识别病毒基因的活性：①从病毒粒体中鉴定出蛋白质；②利用经典的病毒遗传学方法。迄今这些方法仍然被应用着。

1. 病毒中存在的基因产物

Fraenkel-Conrat 和 Singer (1957) 把 TMV 的一个株系的 RNA 包裹在另外一个明显不同的株系的蛋白质之中。在体内复制产生的这个体外“杂种”的子代病毒的外壳蛋白与提供 RNA 的株系的外壳蛋白一致。

自这个经典的实验以来，人们已经普遍认为病毒的基因组编码外壳蛋白。同样地，人们通常认为病毒粒体中存在的其他蛋白质也是由病毒编码的，例如，呼肠病毒科病毒和弹状病毒科病毒（rhabdoviruses）编码的那些蛋白质。

2. 病毒的经典遗传学

利用两种经典的遗传学方法已经鉴定了病毒基因组的多种生物特性，并且这两种方法在适当的条件下仍然十分有用。

a. 多分体病毒的功能定位

基因组分装在 2 个或 3 个粒体中的病毒的发现使得将特异性功能定位于特定 RNA 分子上成为可能。这种分析的要求与步骤如下：

（1）病毒的纯化。

（2）基因组成分的分离：用蔗糖或铯盐（cesium salt）密度梯度离心来分离核衣壳粒体，或通常用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离有生物活性的基因组的各种 RNA。

（3）构成最小病毒基因组的成套 RNA 分子的确定。

（4）分离和鉴定具有不同的生物和物理特性的天然株系（natural strain）和人工突变株（artificial mutant），这些不同特性将成为一些适宜的实验标记（experimental marker）。例如，Dawson (1978a) 分离到了一套温度敏感型的 CMV 突变体。其中一组突变被定位于 RNA 3 上，其余突变被定位于 RNA 1 上。

（5）不同的株系或突变体的组分以各种组合在体外的替代。把这些重组体接种到适当种类的寄主植物上，可以确定不同重组体的生物学和物理特性。通过对实验结果的分析，我们可以把某种特性定位于一个或数个特定的基因组片段上。

（6）反向混合（back-mixing）实验。在这类实验中，将从人工杂种分离的亲本基因组片段与原来的组合相混合并测验其物理或生物学特性。在需要验证杂种病毒的 RNA 在复制期间是否保持其同一性（identity）时，这类测验是必要的。

（7）互补测验（supplementation test）。该测验为体外重配（*in vitro* reassortment）提供了备选方案。将单个野生型基因组的若干个片段加入到一个有缺损的（突变体）接种体中，如果在特定混合物中能恢复野生型性状（wild-type character），就表明那一个片段控制着该性状（Dawson，1978a）。表达一个特定的基因组片段的转基因植物也可以用于互补测验。

（8）突变体的混合。可以将两个不同的突变株的不分级的制备物粗提物（unfractionated preparation）加以混合并接种，如果野生型特性（wild-type property）恢复，则可认为这两个突变存在于不同的 RNA 片段上。

互补测验和突变体的混合不需要突变体病毒的纯化与分级分离（fractionation）。它们可作为对从体外替代实验结果的独立验证（independent confirmation）（de Jager，

1976）。

各种因素可能会使重配实验分析复杂化：

（1）某些特定性质可能是由位于同一个或不同 RNA 片段的一个以上的基因决定的。

（2）某些基因是多功能的（pleiotropic）（即具有一种以上的作用）。例如，AMV 的外壳蛋白能参与病毒的包装、蚜虫传播、RNA 复制以及病毒在植物体内的移动等过程（Tenllado and Bol，2000）。

（3）如果该 RNA 的某些部分可产生两个具有不同功能的蛋白质（如利用通读机制），那么，一个碱基的改变会导致两种功能的改变。

（4）一些氨基酸的替换可能不影响该蛋白质的一种特性，但可能会影响其另一种特性。

然而，使用这些方法已经把一些病毒基因的很多活性定位于多分体病毒的一个或多个基因组片段上。特定寄主的局部或系统症状、寄主范围和病毒粒体中存在的蛋白质等是经常检测的病毒的有关活性。必须承认，这些重配实验有两处局限性：①对于 RNA 或 DNA 片段上存在着多于一个基因的情况来说，实验结果不能将某种活性定位于一个特定基因。②除了结构蛋白质之外，不能证明该基因产物具有这种活性。原则上讲，该活性可能是该核酸的直接作用。

b. 自然和人工诱导的病毒突变体

研究自然存在的或人工诱导的病毒的突变体已经鉴定了病毒的各种活性，并且其中许多活性涉及病毒的多种生物学特征。

那些在正常（许可性）温度下复制异常，或者在非许可（较高的）温度下根本不能复制的突变体特别有用。这样的温（度）敏（感）型（temperature-sensitive，*ts*）突变体很容易分离和操作，而且许多基因看来对这种突变都是潜在敏感的。当病毒基因组中发生一个（或数个）碱基的改变导致蛋白质中的一个（或数个）氨基酸的替换时，会造成在非许可温度下的功能缺损。

另一方面，碱基的改变会影响基因组中非翻译部分如控制元件（control element）的功能。因此，实验的目的是收集并研究特定病毒的一系列温敏突变体。为了对研究复制有用，温敏突变体必须具有以下特征：①在非许可温度下，它们不能表现为显著“渗漏”；②病毒突变体在许可和非许可温度条件下向野生型病毒的回复突变率（rate of reversion）应足够低以适应对突变体的长时间的培养和保持。

如果所研究的突变发生于外壳蛋白基因上，并且该外壳蛋白的氨基酸序列已明确，则可能直接把突变定位于该蛋白质之中。突变在其他病毒基因的定位必须有核苷酸序列和基因组组构信息。称为 LS1 的 TMV 的温敏株系就是一个很好的例子。该株系在 22℃能正常复制，但在非许可温度（32℃）条件下，该株系与亲代病毒（TMV-L）相比复制量非常低。Nishiguchi 等（1980）研究了这两个株系在两种温度下的复制和移动情况，用荧光抗体染色鉴定了病毒发生复制的细胞。

实验结果如图 7.9 所示，LS1 在细胞间移动的功能存在缺陷。然而，这些结果并不能把所涉及的细胞间移动功能加以定位，而是必须在了解 TMV 的基因组组构以及结构内突变位点之后（参见第 9 章第Ⅱ节 D. 2. a 部分）。病毒突变体和其他变株的细节将在

第 17 章进一步讨论。

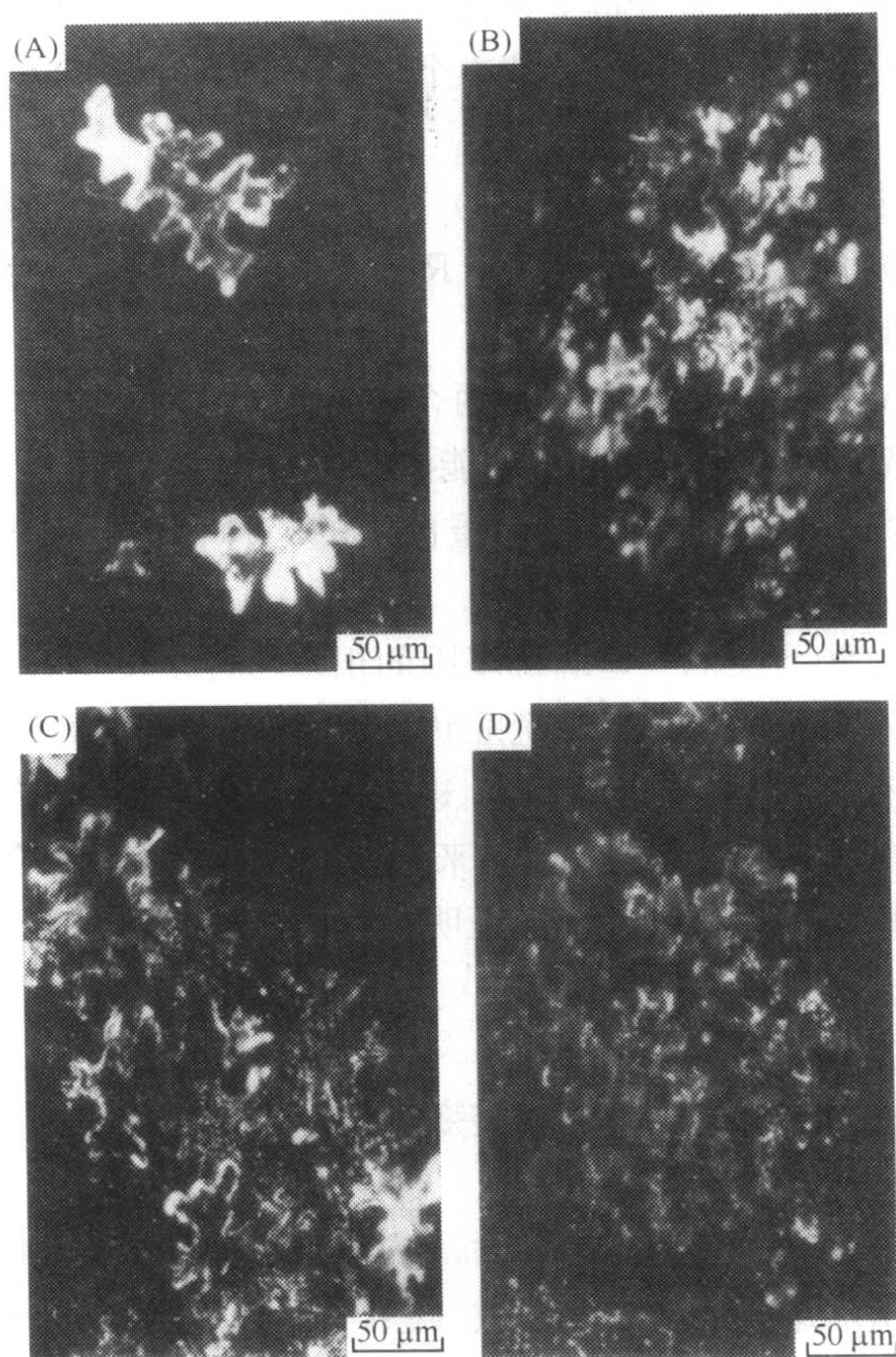


图7.9　一个细胞间转运功能缺陷型 TMV 的 *ts* 突变体的实例。接种后24 h 表皮细胞的荧光抗体染色显示外壳蛋白抗原的分布情况。在许可性(permissive)和非许可温度下番茄小叶(leaflet)分别受到 TMV 的 *ts* 株系(L_{S1})或野生型株系(L)的侵染。接种的小叶在下述温度下分别培养 24 h：(A)L_{S1}在32℃；(B) L_{S1}在 22℃；(C) L 在32℃；(D) L 在 22℃；经允许，引自 Nishiguchi 等(1980)。

D. 基因活性与功能性可读框的对应

目前有很多方法可用来把某一病毒基因产物的体内功能（*in vivo* function）定位于某一特定的可读框。其中一些方法可以明确地提供功能的证据；另外一些方法对一些特殊功能有或多或少有力的提示。这些方法大体分为两类：第一类可能是不常用的方法，从受侵染的组织中分离得到天然的基因产物，然后用直接方法研究其活性；第二类方法总是直接或间接地涉及重组 DNA 技术的应用。

1. 蛋白质功能的直接测定

病毒编码的一些非外壳蛋白的蛋白质功能可以在体外实验中得到鉴定。

a. 关于体外翻译产物

Carrington 和 Dougherty (1987a) 构建了一个质粒表达载体，能使 TEV 基因组的特定片段产物进行无细胞合成。对纯化的 RNA 在兔网织红细胞裂解物中翻译合成的蛋白质可以鉴定它们是具有蛋白酶活性还是有作为蛋白酶底物的能力。用这种方法，他们证明 40 kDa 蛋白质是病毒的蛋白酶。Thole 和 Hull (1998) 利用体外转录和翻译系统，分析诱变的 cDNA 的产物，表明 RTSV 的 35 kDa 蛋白质具有蛋白质水解活性并且在多聚蛋白中鉴定了潜在的切割位点。

b. 关于从受侵染细胞中分离的蛋白质

Thornbury 等 (1985) 从 PVY 侵染的病叶中纯化了蚜虫传播的蛋白质辅助组分，证明其分子质量为 58 kDa。他们从另外一种马铃薯 Y 病毒属病毒分离出相应的蛋白质，并制备了针对这两种蛋白质的抗血清。体外蚜虫喂饲实验表明，抗血清特异性地抑制了此种病毒传播介体——蚜虫的传播。这些实验表明多肽对辅助组分的活性是必不可少的。在昆虫细胞中表达 CaMV 的 ORF II 的产物与一种杆状病毒产物的重组蛋白后，重新得到了 CaMV 的蚜虫传播活性 (Blanc *et al.*, 1993)。然而，若在大肠杆菌中表达，则该蛋白质就没有活性。

2. 依赖于 DNA 重组技术的方法

a. 自发点突变的定位

即使蛋白质产物尚未分离到，仅仅根据天然的病毒变体 (variant) 的核苷酸序列的知识就可以把点突变定位于某特定基因。已发生改变的或缺损的功能可以用这种方式定位于特定基因。TMV 的温敏突变体 L_{S1} 可以作为一个典型的例子来说明这一点。在非许可温度条件下，它能在原生质体内复制、形成病毒粒体和侵染叶细胞，但是不能在叶片中进行细胞间移动。将突变体 L_{S1} 和亲代的核苷酸序列比较表明 L_{S1} 突变体是在 30 kDa 蛋白质基因中发生了一个单碱基的变化造成丝氨酸代替了脯氨酸 (Ohno *et al.*, 1983b)。该实验表明30 kDa蛋白质虽然不能完全确定，但很有可能参与了细胞间运动。

b. 点突变、缺失或插入的利用

许多 DNA 病毒的基因组和 RNA 病毒的 cDNA 都已经被克隆，并且这些 DNA 或其转录物已证明具有侵染性。在通过点突变、缺失或插入方式改变可读框等手段来阐明基因的功能方面有很多实验的例子。在特定 RNA 病毒基因中引入设定的突变以便研究其生物学效应并最终确定基因功能的技术一般称为反向遗传学 (reverse genetics)。这个方法对了解本书中所介绍的基因功能非常重要。

c. 重组病毒

利用重组 DNA 技术可以把具有不同特性的相近病毒株系的不同片段构建成可生存的 (viable) 病毒，并且把该特性与特定的病毒基因相联系。例如，Saito 等 (1987a) 构建了含有两个 TMV 株系的基因组片段的可生存的各种重组病毒。只有一种重组体能引起含有 *N′*基因的绒毛烟 (*Nicotiana sylvestris*) 出现局部坏死症状。他们的结果表明对应于植物中 *N′*基因的病毒成分是由外壳蛋白基因编码的产物。寄主的这种反应将在第10章第Ⅲ节 E.1深入讨论。

在体外构建重组体的应用的另一个例子是 Woolston 等 (1983) 有关 CaMV 的工

作。他们利用这个病毒的蚜虫可传播的株系与蚜虫不可传播的株系的杂种病毒去侵染植物。结果表明蚜虫传播特性和 18 kDa 蛋白质的合成活性定位于 ORF Ⅰ或 ORF Ⅱ。缺失实验表明 ORF Ⅱ就是蚜虫传播相关的基因。

也可以用不同的病毒构建成可生存的重组杂种病毒。Sacher 等（1988）用有活性的 cDNA 克隆将 BMV RNA 3 的天然外壳蛋白质基因替换成 SHMV 的外壳蛋白基因。SHMV 的装配起点（origin of assembly）位于外壳蛋白基因中。在用 BMV 的 RNA 1 和 RNA 2 共接种的大麦原生质体中，该杂种的 RNA 3 因受到 BMV 反式激活因子的作用而得到复制，但是被 TMV 外壳蛋白包装形成杆状粒体，而不是通常的 BMV 的二十面体结构。

重组体的进一步应用是用荧光或其他探针来标记基因产物，以追踪该基因产物在植物和原生质体中表达和积累的位置。这将在第 9 章第Ⅱ节 B 部分更详细地讲述。

d. 基因在转基因植物中的表达

随着病毒的侵染性克隆基因组的突变实验，用病毒（以及其他）的序列转化植物的技术对于理解病毒基因和控制功能已经有重要的影响，并且有许多在转基因植株中表达的例子。现在，许多转病毒基因的植物应用于科研之中。这些技术在很多文章中，Old 和 Primrose（1985）以及 Draper 和 Scott（1991），都有详细的描述。这个方法的基本特点是：将一个含有目标基因、启动子（通常是 CaMV 的 35S 启动子）（参见第Ⅳ节 D. 1）及转录终止子序列的构建物导入合适的植物材料中。该植物材料原来为原生质体，但是现在常为胚细胞悬浮液或类似的可再生成植株的分生组织。目前有两种常用的方式将构建物导入植物材料中。第一种是基因枪方法：先用转化的质粒载体包被在微粒（small microparticle）的表面，然后用一种炸药或高压轰击把微粒打入到植物组织之中。另外一种方法是充分利用土壤杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）的 Ti 质粒的整合特性，携带病毒基因插入进植物的基因组中。其基本过程是：将目标构建体插入 T-DNA 质粒中，该质粒保留着整合特性（Old and Primrose，1995）但没有诱导肿瘤的基因；然后与植物组织混合培养以让构建物整合到植物的染色体中。

在以上两种方法中，经常利用选择性标记（通常是一些抗生素抗性基因或耐杀虫剂基因），以便鉴定、分离转化成功的植物转化体。

e. 细菌、酵母和昆虫细胞系统

现在有许多表达蛋白质的细菌系统以及商品化的试剂盒可以使用。一般的做法是：把目的蛋白的基因克隆到表达载体的适当位点中，然后转化到一种细菌（通常是大肠杆菌）中表达蛋白质。若使目的蛋白基因的 5′端或 3′端（相应于其蛋白质产物的 N 端或 C 端）与一个已知序列（标签）以同相位（in frame）的方式相连接，则产生的目的蛋白就被加上标签（tag）以便于纯化。植物病毒蛋白在细菌中表达时存在的问题主要为以下几个方面：①它们在原核系统中表达以后，不能像在真核系统中那样会受到修饰（如磷酸化或糖基化等）；②核细胞的酶如一些蛋白酶等可能以不同于真核细胞的方式对表达的蛋白质进行加工；③它们可能对细菌细胞有毒害作用。

目前有两个真核表达系统常用于表达植物病毒的基因产物。一个常用的载体来自于苜蓿银纹夜蛾多核型多角体病毒（*Autographica californica* nuclear polyhedrosis virus，AcMNPV）。该病毒是对节肢动物有致病性的包含体型病毒（occluded viruses）

的大科——杆状病毒科（*Baculoviridae*）的成员。杆状病毒科病毒的粒体包被于大型蛋白质晶体中，该晶体的基质主要是由一种 29 kDa 的蛋白质——多角体蛋白（polyhedrin）组成的。在杆状病毒表达系统中，多角体蛋白是病毒复制所不需要的，因而可以由目的基因取代（Smith *et al.*，1983；Lucknow and Summers，1988b）。一旦用杆状病毒侵染一种昆虫细胞系（cell line）如来源于草地夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）的 Sf21 细胞系，外源基因即可在多角体蛋白启动子的驱动下得以表达。这种杆状病毒表达系统有多种形式的变体（King and Pos，1992）。

另一个真核表达系统是酵母表达系统。现在有大量的关于酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的经典遗传学和分子遗传学的资料可供参考（Botstein and Fink，1988；Ausubel *et al.*，1998），有关另一种酵母（*S. pombii*）的资料也在日益增多。有很多载体系统可供在酵母中表达外源基因使用。在第 8 章（第Ⅲ节）将讨论到，酵母系统可用于分析蛋白质之间的相互作用，并且还可以阐明病毒复制的细节（参见第 8 章第Ⅲ节 A. 6 部分）。

f. 杂交体扣留和杂交体选择方法

杂交体扣留（hybrid arrest）和杂交体选择方法（hybrid selection procedure）能被用于证明特定的 cDNA 克隆中含有一种特定蛋白质的基因。在杂交体扣留实验中，克隆的 cDNA 与 mRNA 杂交，再把 mRNA 在一种体外系统中进行翻译。杂交体不能翻译，因此了解未表达的多肽就可鉴定 cDNA 上的相关基因。

就杂交体选择方法而言，首先将 cDNA-mRNA 杂交体分离出来并把两者解离（dissociated）分开。再将 mRNA 进行体外翻译来确定编码的蛋白质。在合适的条件下，这些方法可用于鉴定基因的功能。例如，Hellman 等（1988）用改造的杂交体扣留方法获得了 TVMV 中蛋白酶基因的证据。

g. 与已知功能的基因进行序列比较

如第Ⅲ节 B. 2. d 部分所述，序列比较可用于获得某特定可读框具有功能的证据。这些信息对基因的真实功能的预测也有很大的价值。例如，依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（RdRP）的基因就是通过这种方法定位的。Kamer 和 Argos（1984）的研究表明脊髓灰质炎病毒（poliovirus）的蛋白质和其他一些植物病毒编码的蛋白质之间存在一定的氨基酸序列相似性。这种相似性可能暗示着植物病毒编码的这些蛋白质可能也具有聚合酶功能。RdRP 的保守氨基酸序列（模体）和许多其他病毒蛋白质产物将在下面的章节加以介绍（有关 RdRP 的介绍可参见第 8 章第Ⅳ节 B. 1 部分）。

h. 基因内部的功能区域

自发突变和缺失等现象可以被用来鉴定基因内部的重要功能区域。然而，通过定点诱变（site-directed mutagenesis）和体外构建的缺失突变体能够以更加系统和主动的方式为我们提供类似的信息。例如，代表 TEV 基因组各个部分的 cDNA 的构建和体外转录以及体外翻译等实验产生，并通过多肽产物活性的测定等研究表明49 kDa的病毒蛋白酶的蛋白酶解活性位于 C 端区域。该区域的氨基酸序列表明它是硫醇蛋白酶（thiol protease），与木瓜蛋白酶（papain）的作用机制相关（Carrington and Dougherty，1987a）。有关蛋白酶的细节将在第Ⅴ节 B. 1. a 部分讨论。然而，使用这个方法时必须采取谨慎态度。许多功能依赖于蛋白质的三维结构，而在活性位点以外发生的突变可能对

蛋白质结构有次级作用（secondary effect）。

第Ⅳ节　mRNA 的合成

如前所述，Baltimore（1971）指出所有病毒的表达都必须通过 mRNA 阶段。许多属的植物病毒中的正义 ssRNA 在进入寄主细胞后可直接作为 mRNA 进行翻译。对其他类型的基因组而言，必须在侵染循环的某个阶段合成 mRNA。

A. 负义单链 RNA 病毒

所有负义 ssRNA 病毒都在其粒体中包裹着 RdRp 酶。因此，在进入寄主细胞后的早期事件之一，就是从病毒基因组转录产生正义 RNA，既用于病毒遗传信息的翻译，又作为复制的中间体。这类病毒的复制将在第 8 章第Ⅴ节讲述。在此，我们将讨论 mRNA 是怎样产生的。

1. 植物弹状病毒

植物弹状病毒（plant rhabdoviruses），像那些侵染脊椎动物的弹状病毒一样，含有一个负义 ssRNA 基因组。基因组长为 11～13 kb，编码 6 个蛋白质，比动物弹状病毒多一个基因（参见第 6 章第Ⅵ节 A 部分）。

从 cDNA 克隆的杂交模式研究，Heaton 等（1989a）表明 SYNV 基因组转录成一个短小的 3′端“前导”（leader）RNA 和 6 个 mRNA。因此，植物植物弹状病毒的表达方式类似于动物弹状病毒如疱疹性口炎病毒（vesicular stomatitis virus，VSV）。后者已经被研究得很清楚（Rodriguez and Nichol，1999）：对 VSV 而言，具有活性的转录复合体是由 RNA 基因组与 N 蛋白和聚合酶紧密结合而组成的，而聚合酶是由磷蛋白（phosphoprotein，P）和大蛋白（L）组成的。复合体转录产生正义 RNA 是从基因组 3′端的单一进入位点（single entry site）开始的。首先转录产生的前导 RNA 转运到细胞核内抑制寄主细胞的转录。然后，复合体转录产生 N 蛋白的 mRNA，该 mRNA 在合成过程中即被聚合酶加上帽子结构。在 *N* 基因以及所有基因的末端都是 5′-AGUUUU-UUU-3′序列（元件Ⅰ），该序列标志着 mRNA 转录的终止和该 mRNA 的聚腺苷酸化[产生 poly（A）尾]。基因间序列（intergenic sequence）也包括一个短小的非转录序列（元件Ⅱ）和下一个 mRNA 转录的起始位点（元件Ⅲ）。在植物弹状病毒中也存在着类似的序列（图 7.10）（Jackson *et al.*，1999）。

因此，病毒的基因是从 3′端开始分别转录的，并且其转录量也是递减的（N>P>sc4>M>G>L）（Wagner and Jackson，1997）。这是一个调节基因表达的有效方式，并且位于 3′端的基因正是需求量最大的。

2. 番茄斑萎病毒属病毒

如第 6 章第Ⅵ节 B. 1 所述，番茄斑萎病毒属病毒（tospoviruses）的基因组由 3 个 ssRNA 片段组成。L RNA 是编码病毒的 RdRp 酶的负义、单顺反子的（monocistronic）片段。mRNA 是用病毒粒体携带的聚合酶以病毒粒体中的 RNA 为模板转录产

	I	II	III
保守序列	**AP$_y$UP$_y$UUUU**	**G** N **C**	**P$_y$U**NNN
SYNV	**AUUCUUUUU**	**GG**	AA **UUG** UC
LNYV	**AUUCUUUU**	G(N)$_x$	AAG **CU** UUU
VSV	**ACUUUUUUU**	**G** U **C**	**UUG**UC
RV	**ACUUUUUUU**	**C**(N)$_x$	A **UUG**U G

图7.10　数种侵染植物和动物的弹状病毒基因间区域的序列比对。弹状病毒的共有序列(consensus sequence)列于上部,下面为SYVV、LNTV、疱疹(水泡)性口腔(膜)炎病毒(vesicular stomatitis virus,VSV)和狂犬(病)病毒(rabies virus,RV)。基因间序列(基因接合处的序列)分为三种元件:元件Ⅰ由每个基因组RNA的3′端共有的poly(U)尾构成;元件Ⅱ是一段在mRNA合成时不被转录的短小序列;元件Ⅲ是每条mRNA转录的起始位点。病毒序列中黑体标注的为共有的核苷酸。P_y表示嘧啶,$(N)_x$对应于数目可变的核苷酸。经允许,引自Jackson等(1999)。

生的。

其他的两个RNA具有双义(ambisense)的基因排列,即在病毒(基因组)链(viral strand)和互补链分别存在着一个可读框(ORF)。两个ORF由长度不定的富含AU的基因间区域隔开。就这两个RNA而言,病毒粒体链(义)上的ORF是从互补的(complementary)RNA链上转录形成的亚基因组RNA(sgRNA)翻译表达的,而互补链(义)的ORF是通过转录病毒链RNA产生的亚基因组RNA翻译表达的(图5.42)(de Haan *et al.*, 1990; Kormelink *et al.*, 1992b; 1994)。据推测,双义可读框之间的基因间区可能形成稳定的发夹结构以控制sgRNA转录的终止。

如第Ⅴ节C.4部分所述,番茄斑萎病毒属病毒的mRNA的形成涉及抢帽子(cap snatching)机制。

3. 纤细病毒属病毒(Falk and Tsai, 1998)

纤细病毒属病毒(tenuiviruses)的基因组组构在第6章第Ⅴ节B.2部分已经讲过。该属病毒的基因组由4个或更多的ssRNA组成。和番茄斑萎病毒属病毒一样,最大的RNA片段是负义的单顺反子结构,并且可能是由与病毒粒体相连的、病毒编码的RdRp合成的转录物上表达的。

该属的其他大多数病毒具有另外的3条RNA,并且每条含有两个可读框以双义的形式排列(参见上一节有关双义排列的内容)(图6.12)。当MSpV和RHBV的病毒粒体RNA在体外翻译时,只能检测到包括NCP和N蛋白质在内的几个蛋白质(Falk *et al.*, 1987; Ramirez *et al.*, 1992)。在一些受侵染的植物和昆虫中存在着一些对应于RNA 2、RNA 3和RNA 4的部分RNA片段。

用链特异性探针（strand-specific probe）做 Northern 杂交分析表明，这些 RNA 在大小和极性上与双义 RNA 上的 ORF 相符合（Estabrook *et al.*，1996；Falk *et al.*，1989；Huiet *et al.*，1991；Huiet *et al.*，1992）。因为发现这些 RNA 片段和多核糖体相连（Estabrook *et al.*，1996），它们可能是以类似于上述番茄斑萎病毒属病毒的转录方式所产生的亚基因组 RNA（图 5.42）。

双义可读框被长度不等的富含 AU 的基因间隔区分割开（de Miranda *et al.*，1994；1995）。研究结果表明具有双义可读框排列的 RNA 的基因间隔区形成发夹结构以发挥终止转录的功能（Emery and Bishop，1987；Kakutani *et al.*，1991）。但是 de Miranda 等（1994）发现 RHBV 的 RNA 3 的基因间隔区的预测的折叠情况因分析的对象而异。如果只对基因间隔区进行计算机辅助的折叠分析，能够预测出稳定的发夹结构，但若在整个 RNA 的背景下分析基因间隔区则不能预测出这种结构。

如第Ⅴ节 C.4 部分所述，MSpV 的亚基因组 RNA 的形成涉及抢帽子机制。现已证明番茄斑萎病毒属的 TSWV 和纤细病毒属的 MSpV 等病毒也有抢帽子的机制（Estabrook *et al.*，1998）。很可能其他的纤细病毒属病毒也存在这种情况。

B. 双链 RNA 病毒

侵染植物的呼肠病毒科病毒

呼肠病毒科（*Reoviridae*）的植物成员分为 3 个属：植物呼肠病毒属（*Phytoreovirus*）成员的基因组由 12 条双链（ds）RNA 组成，而斐济病毒属（*Fijivirus*）和水稻病毒属（*Oryzavirus*）病毒基因组均由 10 条双链 RNA 组成。这些属的基因组组构在第 6 章第Ⅵ节已讲过。大多数双链 RNA 都是单顺反子，但下面几种是例外：斐济病毒属 RBSDV 的片段 7 和 9、MRDV 的片段 6 和 8、OSDV 的片段 7 和 10；植物呼肠病毒属 RDV 的片段 11 与水稻病毒属的片段 4 是双顺反子的（bicistronic），即具有两个可读框。RDV 的片段 12 可能有 3 个可读框。然而，至今没有证据表明这些片段的下游可读框是否能够表达。

侵染植物的呼肠病毒科病毒（plant reoviruses），与侵染脊椎动物和昆虫的同科病毒一样，含有一个转录酶（transcriptase），即能以粒体内的 RNA 为模板产生 ssRNA 拷贝。就侵染动物的呼肠病毒科病毒（animal reoviruses）而言，该过程是在包含部分外壳、聚合酶和双链 RNA 的亚病毒粒体（subviral particle）中进行的（Joklik，1999）。在侵染的早期阶段，只合成正义 ssRNA 以作为 mRNA 使用。随后合成负链为复制所用（参见第 8 章第Ⅵ节 A）。侵染植物的呼肠病毒科病毒很可能也有类似的过程，尤其是在其昆虫介体内增殖时。

C. DNA 病毒

无论是花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）的 dsDNA 病毒，还是双生病毒科（*Geminiviridae*）和矮缩病毒科（*Nanoviridae*）的 ssDNA，其 mRNA 的合成均是由位于寄主核内的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶Ⅱ（DNA-dependent RNA polymerase Ⅱ）合成的，没有病毒编码的酶的参与。合成过程是以病毒的启动子序列起始的，因此本节

将讨论植物 DNA 病毒的这些启动子序列的特征。植物病毒的 DNA 启动子序列已经在植物的基因表达载体中广泛应用（参见第 16 章第Ⅸ节 B.1）。

1. 花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）

该病毒科的基因组组构已经在第 6 章第Ⅳ节描述过。大多数详细的研究都是用 CaMV 为对象得出的，大多数结论适合于本科其他成员。

如后面第 8 章（第Ⅶ节 B）所述，CaMV 的复制分为两个阶段，即核内转录阶段和细胞质内的基因表达与反转录阶段。最初，侵染性粒体的 dsDNA 移动到细胞核内，在核内先去除不连续区（gap）处重叠的核苷酸残基，随后不连续区共价闭合形成完整的 dsDNA。如图 6.1 所示，这些小染色体（minichromosome）利用寄主的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶转录为 19S 和 35S 两种 mRNA。病毒的 DNA 除具有这两种 mRNA 的启动子外，还含有转录终止后添加 poly（A）尾的信号（序列）。

a. 35S 启动子（Hull *et al.*，2000）

鉴定启动子需要将转录物的 5′端定位于病毒基因组上。下列病毒的 35S RNA 的启动子鉴定已经完成：CaMV（Odell *et al.*，1985）、CsMV（Verdaguer *et al.*，1996）、FMV（34S 启动子）（Sanger *et al.*，1990；Maiti *et al.*，1997）、MMV（Day and Maiti，1999）、PClSV（Maiti and Shepherd，1998）、SoyCMV（Hasegawa *et al.*，1989）、SVBV（Wang *et al.*，2000）、CoYMV（Medberry *et al.*，1992）、RTBV（Bhattacharyya-Pakrasi *et al.*，1993；Chen *et al.*，1994）、SCBV（Tzafrir *et al.*，1998；Shenk *et al.*，1999）。研究这些启动子的方法包括先构建含有启动子和一个报道基因（reporter gene）的载体，报道基因通常为表达 β 葡糖醛酸糖苷酶（β-glucuronidase，GUS）的 *uidA* 基因。然后再将表达载体转化到植物中表达或瞬时表达。启动子区域通常包括转录起始位点（transcription start site）上游数百个核苷酸和下游一百个以内核苷酸之间的区域。在分析与启动子的强度（strength）和组织特异性（tissue specificity）相关的区域时，可以利用诱变和缺失分析法。

这些研究表明启动子序列包括转录起始位点上游的核心启动子（core promoter），以及起始转录位点上下游的各种控制元件。核心启动子是通过在转录起始位点上游大约 25nt 处称为 TATA 框（TATA box）的区域鉴定的（表 7.1）。

表 7.1　花椰菜花叶病毒科某些成员的已知及推断的启动子序列

	as-1 序列	TATA 序列	转录起始	poly（A）信号
CaMV	7850 cacTGACGtaagggaTGACGcac	34ctcTATATAAgca	21 ACACGCG	154 atcAATAAAttt
CVMV	7380 tgaAGACGtaagcacTGACGaca	34tccTATATAAgga	24 AAGAAAA	
FMV	6857 gtaTGACGaacgcacTGACGacc	13ctcTATATAAgaa		
MMV	aaaTGACGtaagccaTGACGtct	21tccTATATAAgga	15 GAAGAGA	186 atcAATAAAata
BSV	7083 tagTCACGcacga-TGACCttt	181 ctcTATATAAgga	20 ACACGCA	
RTBV	7370	cagTATATAAgga	21 TCATCGA	184 atcAATAAAgct

在转录起始序列中，第一个黑体的核苷酸为转录物的+1 位。空格表示尚没有相应的可靠资料。经允许，数据引自 Sanger 等（1990）；Bao 等（1993）；Verdaguer 等（1996）；Harper 和 Hull（1998）；Dey 和 Maiti（1999）。

CaMV 启动子的详细分析表明它具有模块特性（ Benfey and Chua，1990），并且有数个赋予组织特异性表达程式的亚域（subdomain）。两个主结构域已得到鉴定：结构域 A（位于－90 和＋8 之间，转录起始位点为＋1）对根部特异性（root-specific）表达有重要作用；结构域 B（位于－343 和－90 之间）主要参与地上部分的特异性表达。结构域 A 的－83 和－63 之间的区域包含一个类似 as-1（activation sequence-1，激活序列-1）的元件，对在根部的特异性表达非常重要。

该 as-1 元件存在于多个非病毒的启动子中并且也存在于许多花椰菜花叶病毒属病毒的启动子中（caulimovirus promoter），并有重要作用。结构域 B 分 5 个亚域，其中 B1 和 B5 分别赋予在发育期和成熟期叶片中的特异表达程式（specific expressions pattern）。因此，在整个启动子内，这些结构域和亚域协调性与协同性地（coordinately and synergistically）发挥作用以使 CaMV 的 35S 启动子得以驱动组成性表达（constitutive expression）。可结合该 35S 启动子（ Benfey and Chua，1990；Hohn and Fütterer，1992；Sanfaçon，1992）和 RTBV 启动子（Yin and Beachy，1995）的各种调控区域的植物核内因子已经被鉴定。其他的花椰菜花叶病毒属病毒的启动子也有类似的模块式结构。

例如，CsVMV 启动子中包含有 3 个重叠的区域（Verdaguer *et al.*，1998），其中，－222 至－173 区域控制在绿色组织和根尖中的特异表达，－178 至－63 区域控制在维管束中的特异表达，－149 至－63 区域控制在叶肉组织中的特异表达。有些病毒的启动子需要转录起始位点的下游序列以使表达量最大。就 MMV 的启动子而言，＋33 至＋63 之间的区域是最大表达所必需的（Day and Maiti，1999）。RTBV 启动子驱动的高效转录也需要位于转录物的前 90 个核苷酸的增强子（Chen *et al.*，1996）。该增强子区域包含两个亚元件（subelement），其中一个是不依赖于位置和方向的，另一个是依赖于位置的亚元件。

RTBV 启动子已被详细地分析过（Yin and Beachy，1995；Yin *et al.*，1997a，1997b；Klöti *et al.*，1999），并且表明它包含多个元件（图 7.11）。其中有些作用因子处于转录起始位点的上游，其他的位于下游（Chen *et al.*，1996）。

一些启动子是维管束组织特异性的。如在 RTBV 启动子的－164 和－100 中间区域是其在维管束组织特异表达所必需的（Klöti *et al.*，1999），并且缺失该片段会导致在表皮中特异表达。这种组织特异性对 RTBV 而言是不足为奇的，因为该病毒局限于韧皮部中。然而，CoYMV 的启动子主要是驱动在韧皮部的表达（Medberry *et al.*，1992），而该病毒却可以侵染大多数组织。

虽然花椰菜花叶病毒属病毒的寄主范围有限，但它们的启动子多数既可以在单子叶植物内又可以在双子叶植物内发挥其功能。CaMV 启动子已被广泛地用于许多双子叶植物和单子叶植物的转基因表达，且被认为是一个良好的组成型强启动子（strong constitutive promoter）。它在细菌（Assaad and Signer，1990）、酵母（Pobjecky *et al.*，1990）、动物 HeLa 细胞（Zahm *et al.*，1989）以及非洲爪蟾卵母细胞（*Xenopus*oocyte）（Ballas *et al.*，1989）内也有活性。

b. 19S 启动子

对花椰菜花叶病毒属病毒的 19S 启动子（Rothnie *et al.*，1994）的研究相当少。只有 CaMV 的 19S 启动子经过转基因研究分析表明，与 35S 启动子相比活性较弱。例如，在碧

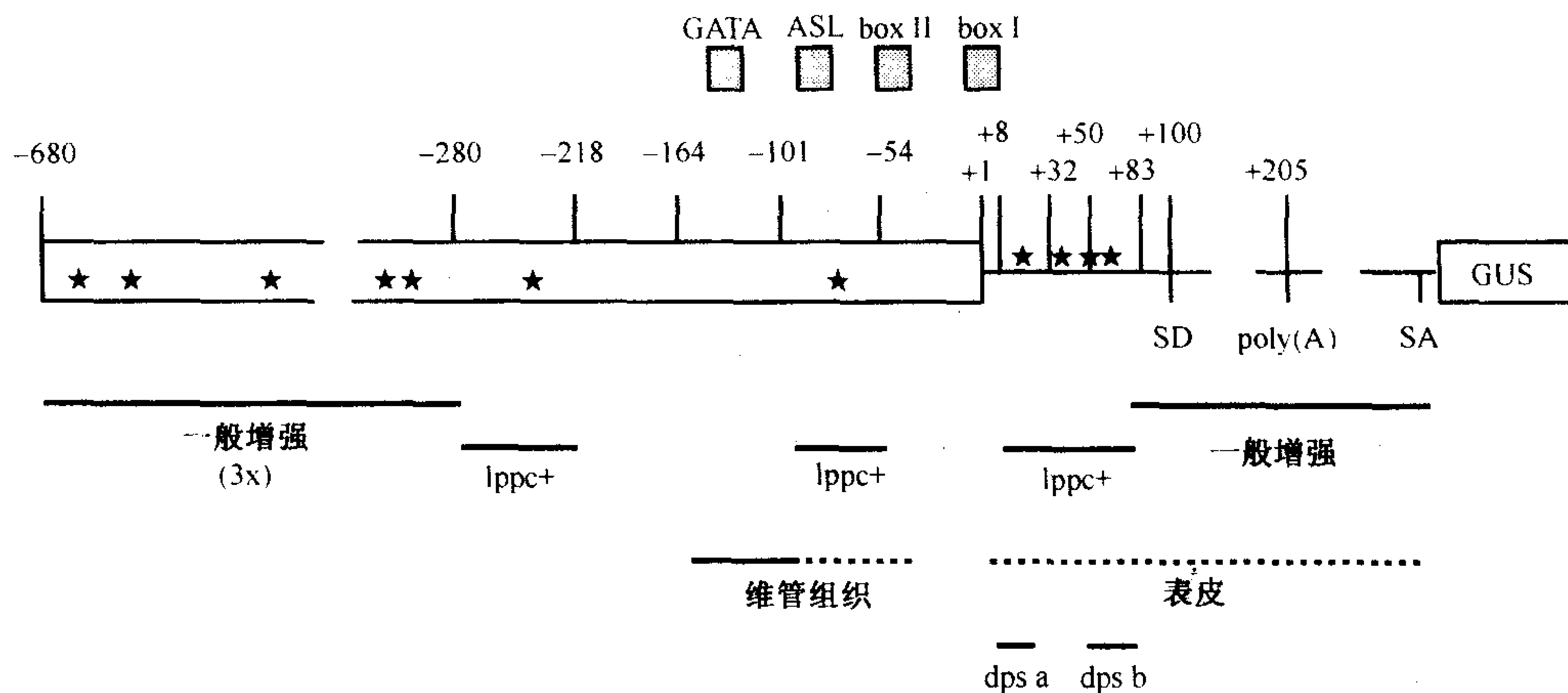


图7.11 水稻东格鲁杆状病毒(RTBV)的启动子中影响表达的元件的结构。从 Klöti 等（1999)的研究推断出的包含在转录调控上有明显活性的不同元件的区域的定位在转录单位(transcription unit)示意图的下面标出。点线表示推测的活性。Yin 和 Beachy（1995）以及 Yin 等（1997a 和1997b)定义的序列元件在图的上面注明。相对于转录起始位点的各个位置也以带“+”或“-”号的数字标出。类似 GAGA 的元件由★表示；SD，剪接供体(splice donor)；SA，剪接受体(splice acceptor)；lppc+，激活持续合成能力(processivity)低的聚合酶复合体装配的区域。承蒙版权所有者(Kluwer Academic Publishers)惠允，引自 Klöti 等(1999)。

冬茄（petunia）植株中表达β-伴大豆球蛋白（β-conglycinin）的α亚基，35S启动子控制下的表达量是19S启动子控制下的10～50倍（Lawton *et al.*，1987）。35S启动子的效率比土壤杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）的胭脂碱合酶基因的启动子还要高10～30倍（García *et al.*，1987a；Saunders *et al.*，1987）。这与病毒侵染的情况形成了鲜明对照，因为病毒侵染时35S RNA和19S RNA的水平是可比性的，并且19S RNA编码的基因产物（即ORF Ⅵ的产物）是表达量最大的病毒蛋白。19S启动子的核心区可以被35S启动子的增强子元件强烈活化，但是尚未发现19S启动子本身的增强子元件。

c. 聚腺苷酸化信号（Rothnie *et al.*，1994）

花椰菜花叶病毒属病毒的35S RNA和19S RNA都拥有共同的3′端（3′ co-terminal）和聚腺苷酸化［poly（A）］信号。此信号模体，AAUAAA，位于转录终止位点的上游，但在转录起始位点的下游（表7.1）。从表7.1和图6.1可以看出，为了产生比相应基因组长的（more-than-genome length）35S转录物，转录终止和聚腺苷酸化信号一定不能太有效以便使RNA聚合酶可以在第一次顺利通过而不被终止。

Sanfaçon和Hohn（1990）提出正是由于转录终止和聚腺苷酸化信号太靠近转录起始信号使得RNA聚合酶第一次通过时，导致转录终止和聚腺苷酸化信号被封闭。然而，聚腺苷酸化的起始并不需要转录起始位点的上游序列，并且有效的聚腺苷酸化的全部信息存在于重复的区域（repeated region）内。这种通过终止信号继续转录的现象并非100%有效，短终止转录物（short-stop transcript）也可以被检测到。在RTBV侵染过程中，有一定量的短终止转录物出现（Klöti *et al.*，1999）。

2. 双生病毒科

双生病毒科（*Geminiviridae*）病毒的环状 ssDNA 基因组在病毒粒体义（链）（virion-sense）与其互补义（链）（complementary-sense）两个方向上均有可读框（图 6.5 至图 6.8）。所有的双生病毒的转录都采用相同的基本策略转录其基因组，即在共同区域（common region）或其附近开始双向转录（有关共同区域的情况参见第 6 章第Ⅴ节 A.2 部分），并在其环状 DNA 直径的对面终止。然而，在转录的细节上各个属之间有差别（Hanley-Bowdoin *et al.*，1999）。现在总结一下转录过程，并介绍一些原始的文献供读者参考。

a. 菜豆金色花叶病毒属病毒

有关菜豆金色花叶病毒属病毒（begomoviruses）的研究大多集中于 TGMV 上。其基因组的 DNA A 组分转录可产生 6 个具有 poly（A）的 RNA，而 DNA B 组分转录出 4 个具有 poly（A）的 RNA（图 7.12）。

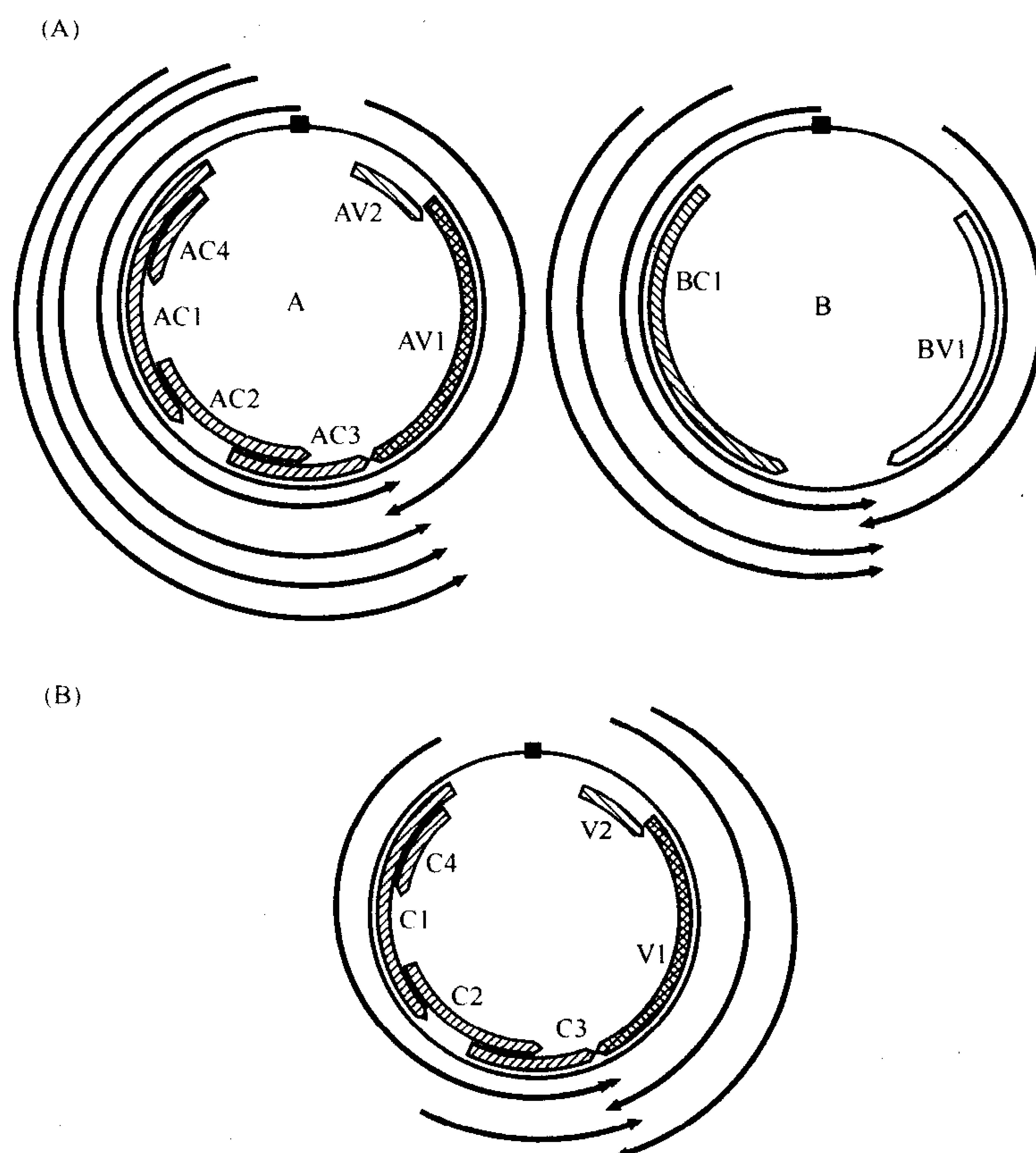


图7.12 菜豆金色花叶病毒属病毒转录的示意图。(A) TGMV；(B) TLCV。其基因组结构如图6.7所示。外边的弧线代表转录物，箭头指向3′端。经允许，数据引自 Sunter 和 Bisaro(1989)及 Mullineaux 等(1993)。

病毒粒体义（链）与其互补义（链）RNA 的聚腺苷酸化的位点有部分重叠，因此它们共享一些 3′核苷酸残基。A、B 两个组分分别产生一个病毒粒体义的 RNA，DNA A 产生的 RNA 翻译表达外壳蛋白，而 DNA B 产生的 RNA 翻译产生 BV1 蛋白。互补义转录复杂得多，并且产生多个具有相同的 3′端和不同的 5′端的、部分重叠的 RNA。TGMV 的 DNA B 组分的 3 个互补义 RNA 的翻译均产生 BC1 蛋白，而 DNA A 组分产生的互补义 RNA 具有不同的编码能力（coding capacity）。最大的转录物，AC61（转录物的命名是根据 5′端，所以 AC61 是来自于 DNA A 组分的互补链，起始于第 61 个核苷酸残基），编码 DNA A 组分的整个左侧（entire left side）并且是唯一一个能编码全长的复制相关蛋白（Rep protein）的基因（复制相关蛋白参见第 8 章第Ⅷ节 D. 4 部分）。AC2540 和 AC2515 可能表达可读框 AC4 ，而就两种最小的 RNA（AC1938 和 AC1629）而言，它们的第一个可读框编码蛋白质 AC2，第二个可读框编码蛋白质 AC3。

TGMV 的 mRNA 编码区的上游具有真核 RNA 聚合酶Ⅱ启动子识别的特征序列（Hanley-Bowdoin *et al.*，1999）。4 条 RNA 的转录均在 TATA 框下游 20～30 bp 处起始，而其他 RNA 具有类似于起始子元件（initiator element）的序列与其 5′端重叠。互补义的 AC61 和 AC1629 的 mRNA 以及病毒粒体义的 AV1 和 BV1 的 RNA 均被详细研究过。AC61 启动子定位于 TGMV 的共同区域并且支持高水平的转录。缺失诱变实验表明它的活性位点在 AC61 转录起始位点的上游 60 bp 处。该区域与正链 DNA 合成起始位点有重叠（参见第 8 章第Ⅷ节 D. 3 部分与图 8. 27）。这些突变证明了转录和复制之间的密切互作。在寄主因子结合序列和 G 框（G-box）上的突变都导致了启动子功能的下降。AC61 启动子是通过 Rep 结合位点自我调节的、对同源的 Rep 蛋白的阻抑（repression）是特异性的。特异性阻抑可能是对转录复合体（transcription apparatus）的主动干扰而不只是空间位阻（steric hindrance）。AC4 蛋白也能对该启动子加以负调控，其结合位点为 G 框上游的顺式元件（*cis* element），而与 Rep 结合位点不同。菜豆金色花叶病毒属病毒的其他大多数类似启动子可能是通过相似的机制调节的。但是在具体细节上有所不同（Hanley-Bowdoin *et al.*，1999）。BC1 启动子序列类似于 AC61 启动子，但是不受转录起始位点和 Rep 蛋白的调节。

对 TGMV 病毒粒体义启动子的研究不如上述对互补义 RNA 启动子的研究那样充分。这些启动子区域包括共同区域和含有 TATA 框的下游序列。病毒粒体义启动子需要 AC2 蛋白的反式激活，并且该激活作用与复制无关。在转基因植物中对 TGMV AV1 启动子的研究表明其调节是复杂的并且在不同的组织中存在差别（Sunter and Bisaro，1997）。AC2 基因的启动子位于 AC1629 转录起始位点的上游，它对 Rep、AC2 或 AC3 没有应答反应（Hanley-Bowdoin *et al.*，1999）。该启动子的调节过程尚不明确，Hanley-Bowdoin 等（1999）讨论了它们调节的可能过程。

菜豆金色花叶病毒属的一些病毒具有单分体基因组（monopartite genome），对其转录的研究没有二分体（bipartite）基因组的病毒详细。4 个主要的转录物已经被鉴定，并且定位于 TLCV 的基因组中（Mullineaux *et al.*，1993）（图 7. 12）。一个转录物跨越 C1、C2 和 C3 三个可读框，第二个转录物覆盖了 C2 和 C3 可读框；C4 可读框位于 C1 内部，这是后来才发现的。在病毒粒体义的一侧有两个转录物，它们具有共同的 3′端，而其 5′端分别

定位于在 V1 可读框的第一个符合读框的（in-frame）AUG 密码子的两侧。

为了分析 TLCV 表达的调节过程，Dry 等（2000）研究了这些可读框与 GUS 报道基因的融合基因分别在稳定转化和瞬时转化的烟草（*Nicotiana tabacum*）组织中的表达情况。他们的实验证明 C2 可读框降低了 V2 可读框的表达量，说明 C2 蛋白质参与了病毒粒体义基因表达的反式激活（transactivation）。TLCV 的 ORF-GUS 构建物在转基因烟草植株中有不同的组织表达特征：C1、C4 和 V2ΔC（V2 的 C 端缺失体）为组成型（constitutive）表达；C2 和 C3 主要是在维管束中表达；V1ΔC 在维管束相关的细胞中表达量降低。

b. 曲顶病毒属病毒

单组分的曲顶病毒属病毒（curtoviruses）在受侵染的植物中能产生六七种蛋白质（图 7.13）。Frischmuth 等（1993）在 BCTV 侵染的植物中发现了大量的病毒粒体义带有 poly（A）尾的 RNA 和 4 条互补义带有 poly（A）尾的 RNA。病毒粒体义 RNA 群体是具有共同的 3′端的重叠转录物，并且其 5′端的位置优势使其能够表达可读框 V1、V2 和 V3。在较大的两个病毒粒体义 RNA 的上游的适当位置存在着两个共有的（consensus）TATA 框，但是有关曲顶病毒属病毒的这些启动子或任何其他启动子的细节尚不清楚。

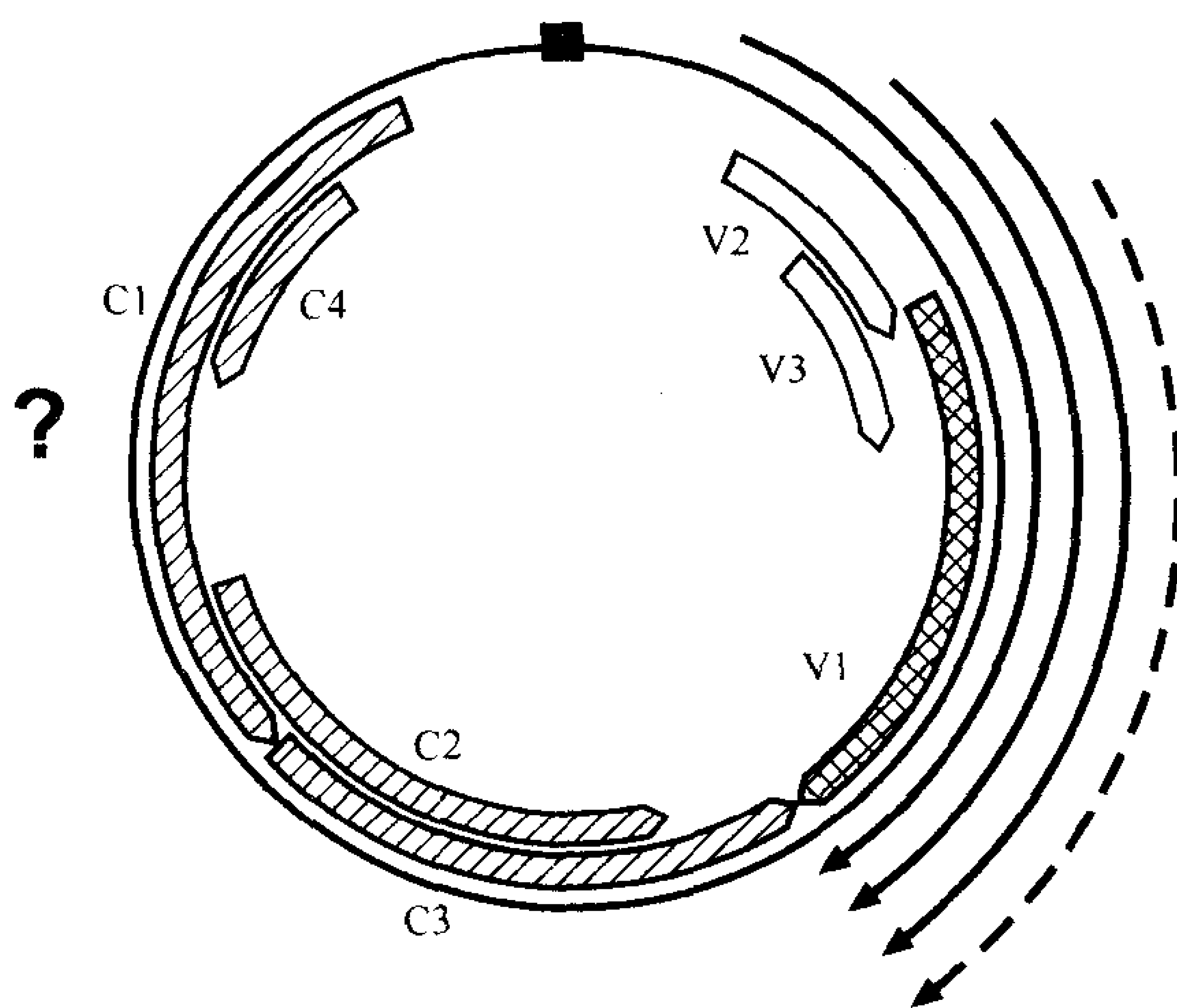


图7.13 甜菜曲顶病毒(BCTV)的转录图的示意图。其基因组结构如图6.6所示。外边的弧线代表转录物，箭头指向3′端。带点的弧线表示次要(量少)的转录物但确对应于 V1，即编码外壳蛋白。这可能是由于在取样时它是次要的转录物，而在另一时段则是主要的转录物。互补链的转录物尚未定位，因为缺失实验会导致对其分析的复杂化。经允许，引自 Frischmuth 等(1993)。

c. 玉米线条病毒属病毒

玉米线条病毒属病毒（mastreviruses）具有单个 ssDNA 组分，编码 4 种蛋白质（图 7.14）。V1 和 V2 是从病毒粒体义的转录物表达的，而 C1 和 C2 是从互补链的转录物表达产生的。

双向的转录有多个起始位点，并且终止于重叠的聚腺苷酸化信号。然而，与其他两个双生病毒属不同的是，在从病毒粒体义和互补义链转录产生 mRNA 的过程中涉及了剪接（splicing）步骤。已发现 MSV、DSV 和 TYDV 等病毒的 C（互补义）转录物的

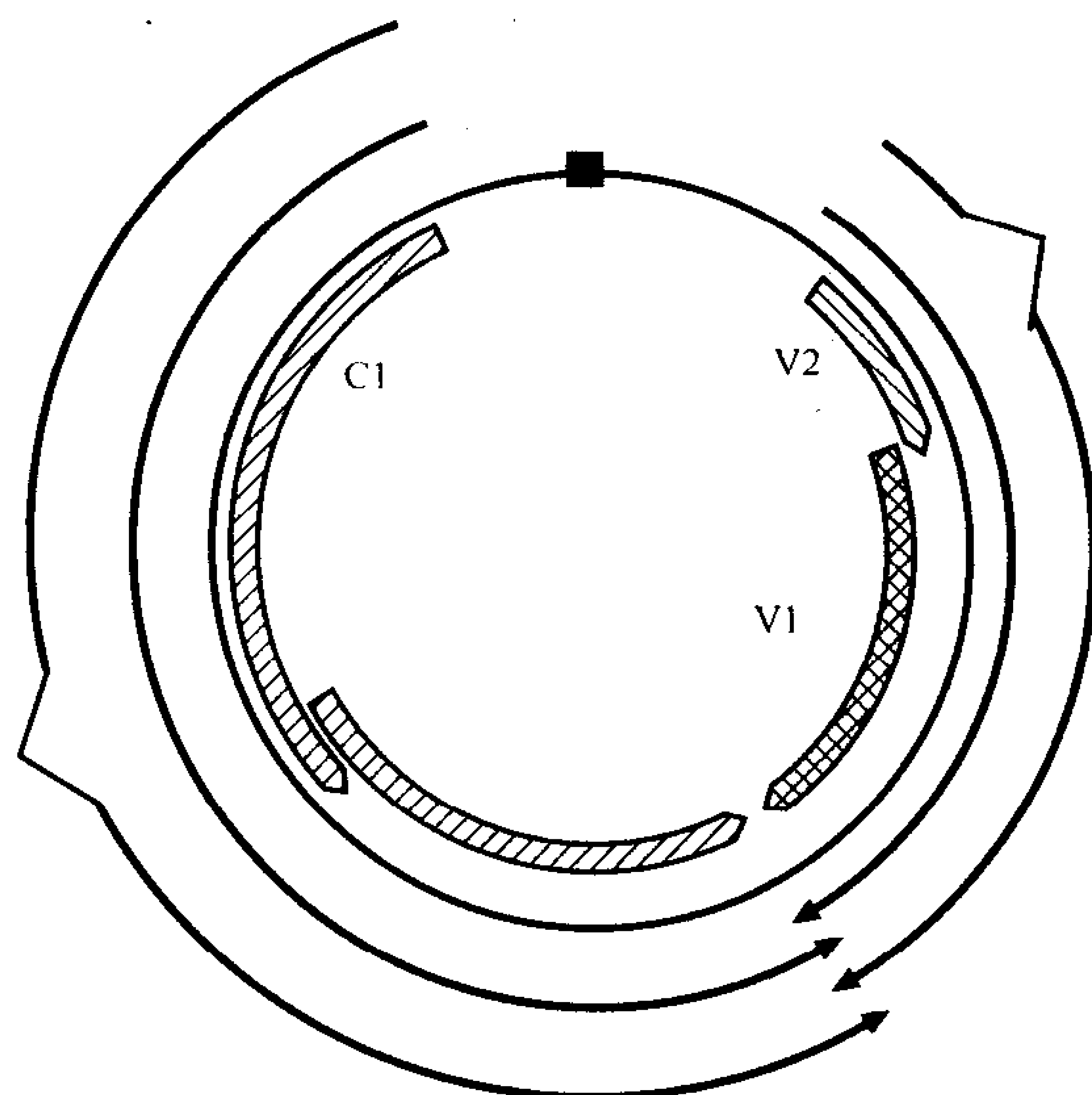


图7.14　玉米线条病毒(MSV)转录图的示意图。MSV 的基因组结构如图6.5所示。外边的弧线代表箭头指向3'端的转录物。外圈弧线中由角线连接的断裂处表示在转录物加工期间剪接出来的内含子位点。承蒙版权所有者(Blackwell Science Ltd.)惠允,引自 Wright 等(1997)。

丰度低，并且通过剪接过程将 C1 融合于 C2 上（Mullineaux *et al.*，1990；Dekker *et al.*，1991；Morris *et al.*，1992）。就 MSV 而言，大约 20%的 C 转录物受到剪接（Wright *et al.*，1997）。MSV 有两个病毒义（V-sense）的转录物，量最大的一种转录物从 V1 可读框上游的第一个核苷酸开始转录，另外一个较长但量少的转录物是从 V1 上游的第 141 核苷酸残基开始转录的（Wright *et al.*，1997）。主要转录物中约有 50%经过剪接产生 V2 可读框，而较长转录物的 10%经过剪接得到 V1 的 mRNA（Wright *et al.*，1997）。

C1 和 C2 的蛋白质产物在早期的病毒复制中发挥重要功能，同时 C1：C2 融合产物也是必不可少的。V1 产物（移动蛋白）和 V2 产物（外壳蛋白）在晚期发挥作用，并且外壳蛋白的需求量远远大于其他 ORF 的产物（蛋白质）。因此，剪接对于玉米线条病毒属病毒的定时（temporal）和定量（quantitative）表达都是非常重要的。在 MSV 基因组的互补链的转录过程中可能涉及了 3 个 TATA 启动子的共有序列（consensus sequence）（Boulton *et al.*，1991b）。如后面第 10 章第Ⅲ节 O.1.d 部分所述，这些启动子之一的突变可能通过影响 Rep 蛋白的合成而间接影响病毒的复制，最终导致了病害症状和寄主范围的改变。利用玉米原生质体瞬时表达系统，Fenoll 等（1988）详细研究了 MSV 的驱动外壳蛋白的 RNA 转录的病毒粒体义启动子的结构。

他们发现在转录起始位点上游的一个 122 bp 的序列能增强启动子的活性。该序列激活 MSV 的核心启动子的作用具有依赖于位置（position-dependent）、但不依赖于方向的（orientation-independent）特点。该激活序列能特异性地与玉米核提取物中的蛋白质结合。该“上游激活序列”（upstream activating sequence）位于大基因间区域，并且还包括共同区域，已被定位于在转录起始位点相关的复制起点发夹模体远侧的两个富含 GC 的框上（Fenoll *et al.*，1990）。

这些富含 GC 的框和 TGMV 的 G 框元件在与各个病毒的发夹结构的相对位置很相似，暗示着它们具有相似的功能（Arguello-Astorga *et al.*，1994）。因此，玉米线条病毒属病毒可能编码类似于菜豆金色花叶病毒属的 AL2/C2 蛋白质的病毒粒体义转录的反式激活因子。

d. 聚腺苷酸化

如图 7.12、图 7.13 和图 7.14 所示，在双生病毒基因组上，转录终止于启动子的对面。该富含 AT 的区域被认为是聚腺苷酸化的信号。然而，对这些病毒的加 poly（A)信号的详细分析尚未进行。

3. 矮缩病毒科病毒

如第 6 章第Ⅴ节 B 部分所述，矮缩病毒科病毒（nanoviruses）的基因组由 6 个或更多的约为 1 kb 的环状 ssDNA 分子组成。每个基因组片段至少能编码一个蛋白质。这些基因组片段的启动子主要是针对 BBTV 详细研究的。Beetham 等（1997）证明 BBTV 的 DNA1 能转录出两条 mRNA，一个覆盖了主要的可读框，另一个是位于大可读框内部的、一个可编码 5 kDa 蛋白质的小可读框。BBTV 的 6 个 DNA 片段的启动子活性已经在烟草细胞悬浮液、香蕉胚细胞以及转基因烟草和香蕉植株内进行了表达分析（Dugdale *et al.*，1998）（图 7.15）。

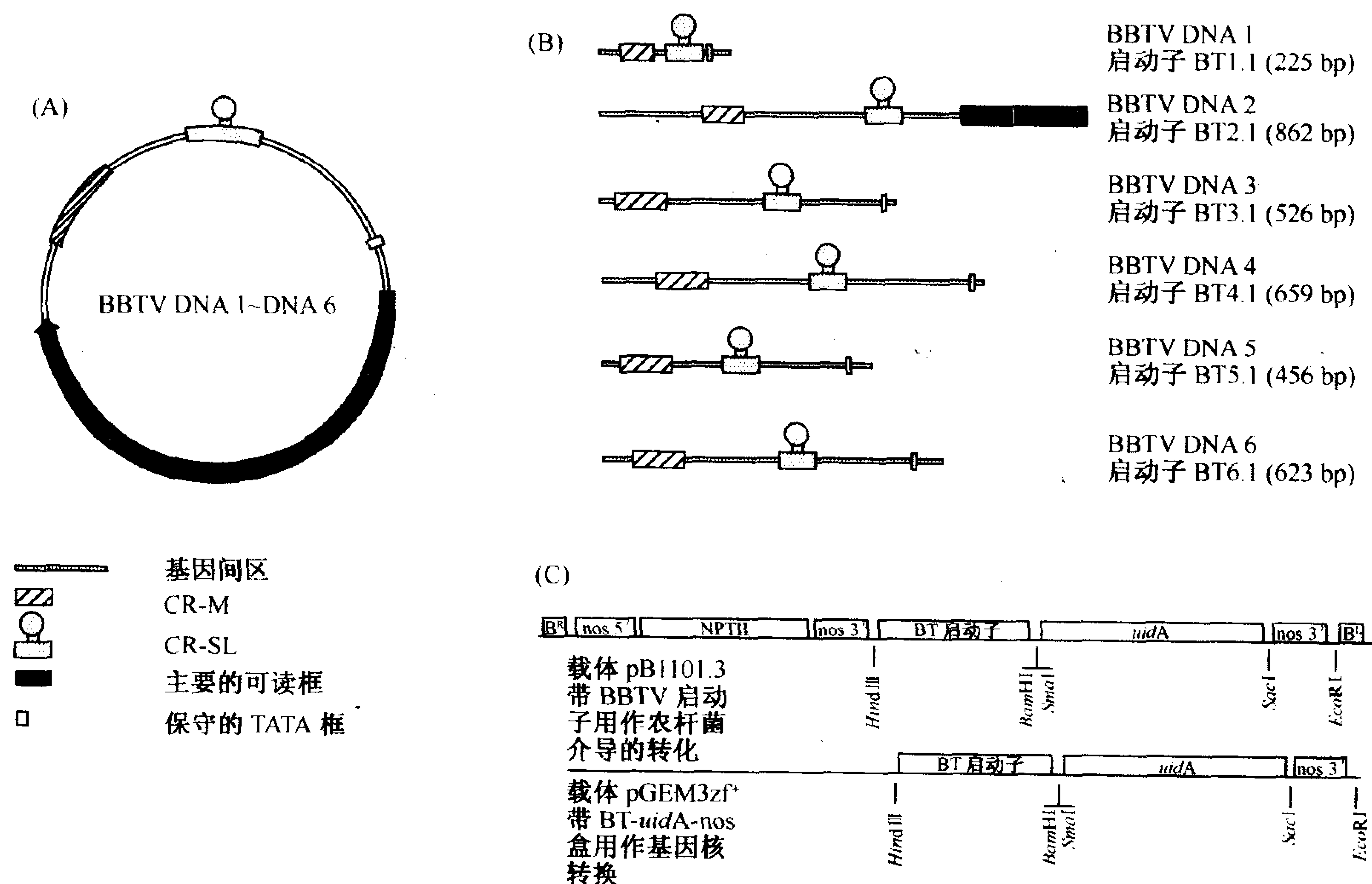


图7.15 香蕉束顶病毒(BBTV)的(A)环状 ssDNA 基因组结构，(B)DNA 1～DNA 6启动子片段，以及(C)克隆策略的示意图。通过 PCR 或者对克隆的组分加以酶切获得了 BBTV 的 DNA 1～DNA 6的启动子片段，并将其插入载体 pBI101.3中的 *uid*A 报道基因上游，以便用于土壤杆菌(*Agrobacterium*)介导的烟草转化。随后将来自每次构建的 BT-*uid*A-nos 盒(序列组件)克隆到 pGEM-zf⁺ 中，通过微弹轰击(microparticle bombardment)进行瞬时表达分析。经允许，引自 Dugdale 等(1998)。

在这些实验中，包含 3 个同源区域的基因组片段的基因间序列都分别被融合于 *uid*A（GUS）和绿色荧光蛋白（GFP）等报道基因上。结果表明：这三个同源区中的两个可能与复制有关（参见第 8 章第Ⅷ节 E 部分），另外一个含有潜在启动子的 TATA 框。Dugdale 等（1998）证明：①BBTV 的 6 个 DNA 的基因间区域具有启动子活性；②它们的启动子活性差别相当大；③不同基因间序列的相对活性在烟草和香蕉体内不同。在烟草悬浮细胞的瞬时表达系统中，DNA 2 和 DNA 6 的启动子控制下的基因表达大于其他启动子。在转基因烟草中，每个启动子在韧皮部的表达都很弱，其中 DNA 6 的启动子控制下的表达最强。然而 DNA 6 的启动子在源自转基因烟草的愈伤组织中的表达活性变高。借助于敏感的 GFP 荧光仅能检测到香蕉胚细胞中在这些启动子的活性，其中 DNA 4 和 DNA 5 的启动子表现出了最高水平的瞬间活性。在转基因香蕉中，DNA 6 的启动子的活性局限于叶片和根的韧皮部、气孔和根的分生组织中。DNA 6 启动子的缺失分析表明强表达必不可少的元件位于翻译起始位点上游的 239 nt 的区域内。

第Ⅴ节　植物病毒的基因组策略

A. 真核蛋白质合成系统

现在一般认为，病毒利用真核细胞的蛋白质合成体系进行翻译表达。该翻译系统有各种特征和调控因子（Gallie，1996）：①植物细胞中的 mRNA 的 5′端具有一个反向的（inverted）、甲级化的 GTP 帽子 [$m^7G(5')ppp(5')N$]结构，而 3′端具有 poly（A）尾；②在大多数情况下，mRNA 仅含有一个可读框（ORF）；③翻译是从起始密码子 AUG 起始的，并且紧邻 AUG 密码子的前后序列（context）控制起始的效率（Kozak，1989；1992）；④帽子结构、5′非翻译区、编码区、3′非翻译区以及 poly（A）尾都可能影响翻译效率和 mRNA 的稳定性。

在解释翻译的扫描模型（Kozak，1989；1992）中，核糖体的 40S 亚基首先结合到 5′端的帽子结构上（图 7.23），然后转位到有适当前后序列的第一个 AUG 处，在此形成 80S 核糖体并只翻译紧邻 mRNA 的 5′区域下游的这一个可读框；在该可读框的终止密码子处，核糖体解离。因此，终止密码子后面的其他可读框一般是不能被翻译的。病毒的基因组，除了卫星病毒之外，都能编码两个或更多的蛋白质。因此它们必须解决的问题是如何在真核系统中表达下游其余的蛋白质。在不同的病毒中看来已进化出各种不同的方式用于克服这种限制以便从病毒 RNA 基因组上翻译基因产物。如上所述，在 AUG 起始密码子前后的核苷酸序列对于翻译起始的效率非常重要。在植物系统中，效率最高的前后序列是 AACAAUGG（Lehto *et al.*，1990a），其中在－3 位上的腺嘌呤和＋4 位的鸟嘌呤（位置编号是相对于 AUG 密码子的 A 而定，A 的位置定为＋1）起着关键的作用。

B. 病毒克服真核翻译系统约束的策略

根据现有的知识，至少有 12 种策略来保证病毒的 RNA 基因组或 DNA 病毒的 RNA 转录物上所有的基因都能在真核蛋白质合成系统中翻译表达（Fütterer and Hohn，1996；Gallie，1996；Drugeon *et al.*，1999）。这 12 种策略分为三类。①通过将

任何下游的 AUG 带到 5′端使病毒基因组 RNA 或其片段成为单顺反子的分子。这是通过几种策略实现的：具有单一可读框只表达一个多聚蛋白，然后切割成有功能的蛋白质（策略 1），或者是把病毒的基因组分成单顺反子的 RNA，有的病毒仅在表达的时候分开（策略 2、11 和 12），有的病毒一直保持这种分开的状态（策略 3）；②避开 5′端 AUG 的约束。有多种策略可以做到这一点（策略 3～策略 8）；③通过把两个相邻的 ORF 合在一起以产生两个大小不同的蛋白质使表达的信息最大化，其中一个翻译自 5′端的 ORF 而另一个翻译自两个 ORF；因此第二种蛋白质包括 N 端的上游蛋白质，而 C 端翻译自下游 ORF（策略 9 和 10）。策略 8、9 和 10 被称为“重编码”（recoding）（Gesteland and Atkins，1996）。

1. 策略 1：多聚蛋白

编码多于一个蛋白质的 RNA（有时为整个基因组）可作为一个可读框来完成翻译。多聚蛋白通过病毒自身编码的一个或数个蛋白酶在特异位点上切割产生最终的基因产物。下面以马铃薯 Y 病毒属病毒为例来介绍该策略的使用情况。

a. 病毒编码的蛋白酶（Dougherty and Semler，1993；Ryan and Flint，1997；Spall *et al.*，1997）

目前认识的病毒编码的 4 类蛋白酶是分别根据其催化部位（catalytic site）而命名的，即丝氨酸型、半胱氨酸型、天冬氨酸型和金属蛋白酶（metallo-proteinase）。其中三种蛋白酶存在于植物病毒中（表 7.2）。

表 7.2　植物病毒编码的蛋白酶

病毒科属	病毒蛋白酶
花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）	天冬氨酸蛋白酶
马铃薯病毒科（*Potyviridae*）	
马铃薯病毒属（*Potyvirus*）	丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、类丝氨酸蛋白酶[a]
大麦黄化花叶病毒属（*Bymovirus*）	半胱氨酸蛋白酶、类丝氨酸蛋白酶
豇豆花叶病毒科（*Comoviridae*）	类丝氨酸蛋白酶
伴生病毒科（*Sequiviridae*）	类丝氨酸蛋白酶
甜菜坏死黄脉病毒属（*Benyvirus*）	半胱氨酸蛋白酶?[b]
玉米细条病毒属（*Marafivirus*）	半胱氨酸蛋白酶
芜菁黄花叶病毒属（*Tymovirus*）	半胱氨酸蛋白酶
长线病毒属（*Closterovirus*）	半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶
马铃薯卷叶（*Polerovirus*）	丝氨酸蛋白酶

注：a. 类丝氨酸蛋白酶（serine-like proteinase）的活性位点有半胱氨酸，但其结构与丝氨酸蛋白酶（serine proteinase）相似。b. 表示对这种蛋白酶的类型尚有疑问。

丝氨酸蛋白酶也称为 3C 蛋白酶（3C protease）[源自于小 RNA 病毒科病毒（picornaviruses）中的表达] 或类胰凝乳蛋白酶（chymotrypsin-like protease）。大多数这类蛋白酶的催化部位是氨基酸三联体（组氨酸、天冬氨酸和丝氨酸），但是有些该类型

蛋白酶中的丝氨酸由半胱氨酸取代；由于后者具有与丝氨酸蛋白酶相同的整体结构，因此被称为类丝氨酸蛋白酶（serine-like proteinase）。丝氨酸残基是异常活跃的，在催化反应期间作为一种亲核物质（nucleophile）将一个电子传递给肽键的羰基碳原子（carbonyl carbon）上导致该肽键被水解。随后，酰基丝氨酸（acyl serine）形成并且把质子由作为活性位点的组氨酸残基转移到即将离去的戊基基团（amyl group）上。该酰基酶随即被水解释放出羧酸产物，因而该活性位点得以再生。丝氨酸蛋白酶主要在谷氨酰胺-甘氨酸（Gln-Gly）、谷氨酰胺-丝氨酸（Gln-Ser）、谷氨酰胺-丙氨酸（Gln-Ala）和谷氨酰胺-天冬酰胺（Gln-Asn）等位点上进行切割（Palmenberg，1990）。

半胱氨酸蛋白酶，也称为类木瓜蛋白酶（papain-like proteinase）或硫醇蛋白酶（thiol proteinase），包含距离非常近并能相互作用的半胱氨酸和组氨酸组成的催化二联体（catalytic dyad）。在水解过程中，半胱氨酸的巯基（sulfhydryl group）作为亲核物质起始攻击多肽键上的羰基碳，促使肽键水解。底物的羰基碳和活性位点组氨酸的巯基形成酰基酶。随后羰基碳从蛋白酶的硫醇基团上水解下来，活性部位的残基得到再生。

天冬氨酸蛋白酶是由两个天冬氨酸残基组成的有催化功能的二联体。它们很可能不形成共价连接的酶-底物中间物，据认为是通过酸-碱催化作用（acid-base catalysis）来完成反应。

病毒蛋白酶对其关联底物（cognate substrate）的作用是高度特异性的，该特异性依赖于蛋白酶和底物的三维结构。例如，CPMV 的蛋白酶不能识别其他的豇豆花叶病毒属病毒（comoviruses）M RNA 的翻译产物的一级结构（Goldbach and Krijt，1982）。这种底物特异性的另一个例子是 Clark 等（1999）报道的有关 CPMV 的实验（CPMV 的多聚蛋白的加工见第Ⅴ节 E. 8 部分）。在这些实验中，编码外壳蛋白的大亚基（L）和小亚基（S）的 CPMV 的 M RNA 被 BPMV 的相应区域取代。这些重组分子在豇豆的原生质体内的复制需要 CPMV 的 B RNA 的参与。58/48 kDa 蛋白质和外壳蛋白大亚基之间的接界处（junction）被切割开。但是，在大小外壳蛋白之间的切割不能完成，因此不能形成病毒粒体，即使该接界序列与 CPMV 的相应位置非常相似也是如此。Clark 等（1999）还在体外兔网织红细胞裂解物系统中翻译了其构建物的转录物。结果表明，当 L-S 之间接界序列与 CPMV 的相应的区域相似时（尽管效率不高），确实发生了反式加工（processing *in trans*）。ToRSV 的 L-S 之间接界序列切割实验也表明，顺式作用比反式作用的特异性更大（Carrier *et al.*，1999）。这些结果说明 L-S 的切割位点不只是由线性氨基酸序列决定的，可能还涉及 L-S 环（loop）与病毒外壳蛋白的 β 桶（β barrel）之间的相互作用。

Yoon 等（2000）建立了 TuMV 蛋白酶的荧光测定法（fluorometric assay）。这说明分子内淬灭的荧光底物可用于 TuMV 的 NIa 蛋白酶（及其他蛋白酶）的连续测定。

b. 马铃薯 Y 病毒属（Reichmann *et al.*，1992；Shukla，1994）

马铃薯 Y 病毒属病毒的大约 10 kb 的基因组包含一个大可读框，可编码一个由 3000～3300 个氨基酸组成的多聚蛋白。Shields 和 Wilson（1987）在 TuMV 的制备物中没有发现亚基因组 RNA 存在的证据。同样，Dougherty（1983）从来自 TEV 侵染的叶片的总 RNA 制备物（total RNA preparation）中也未发现真正的亚基因组 RNA。病毒编码的三种蛋白酶将多聚蛋白切割产生 10 个蛋白质（图 7.16）。

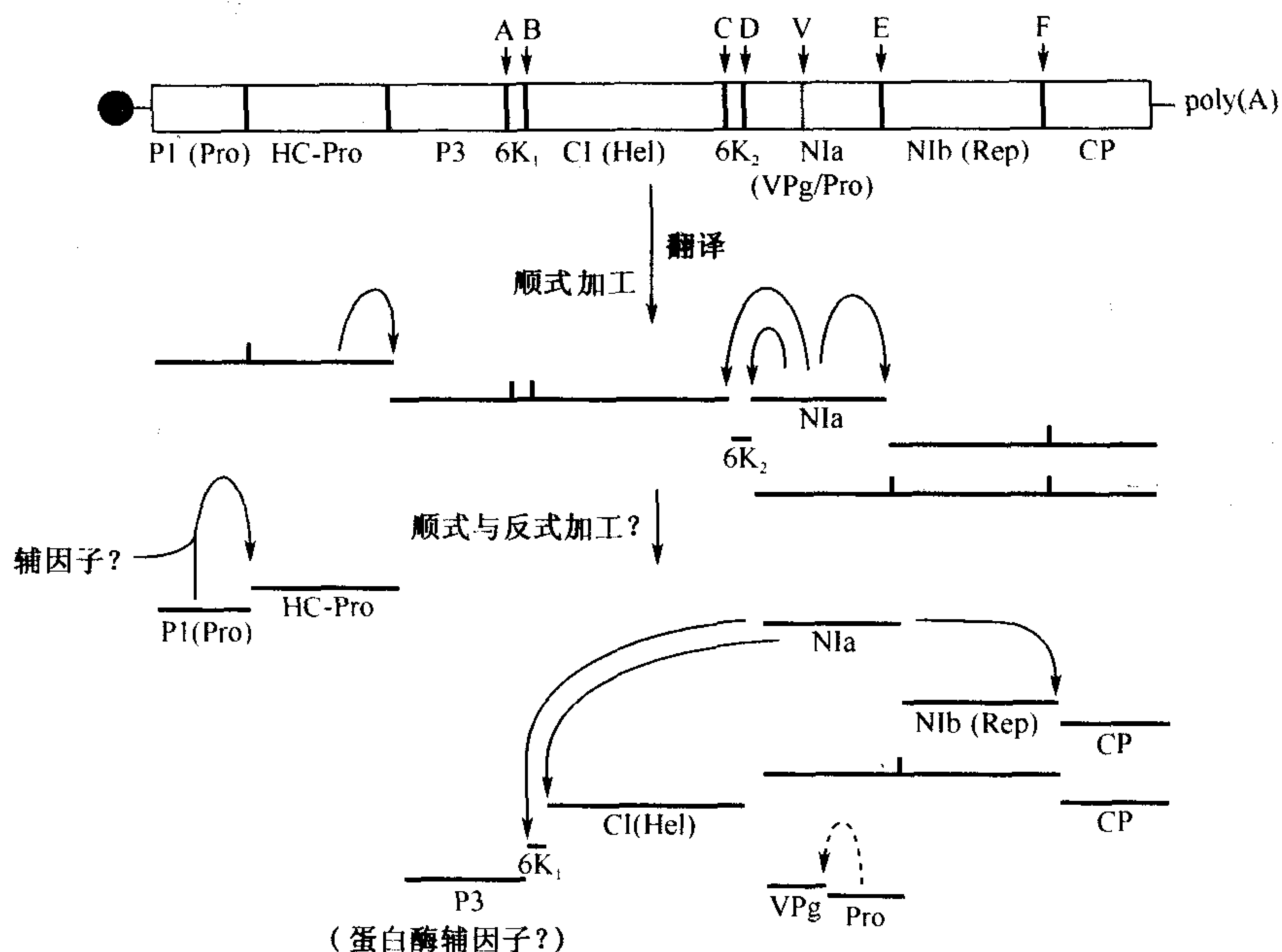


图7.16　马铃薯Y病毒属多聚蛋白加工的示意图。初始的重要事件可能是共翻译与自身催化的反应，生成前体和成熟的产物。目前有关这些事件的顺序的信息很少，也不清楚初级切割产物的C端进一步加工的程度。经允许，引自 Reichmann 等(1992)。

35 kDa 的 P1 蛋白质能从多聚蛋白上的苯丙氨酸-丝氨酸（Phe-Ser）位点自我切割，52 kDa 的 HC-Pro 在其 C 端甘氨酸-甘氨酸（Gly-Gly）处切割；而在 NIa 区域的 27 kDa 蛋白酶域（protease domain）是一个丝氨酸蛋白酶，负责其他位点的切割，其大多数切割位点是谷氨酰胺-(丝氨酸/甘氨酸)［Gln-(Ser/Gly)］。尽管还没有这些切割事件发生的前后顺序的充分信息，但是目前有一些证据表明，某些切割事件有一个前后顺序。例如，HC-Pro 的 C 端的切割产生 P1-HC-Pro，然后 P1 的切割使其与 HC-Pro 分开（Carrington *et al.*，1989a）。

i. 马铃薯Y病毒属病毒的蛋白酶

P1 是丝氨酸蛋白酶，从 P1-HC-Pro 上切割得到 P1（Reichmann *et al.*，1992；Shukla，1994）。在它的 C 端含有一个丝氨酸蛋白酶的活性位点（Hx_8Dx_{30} 或 Dx_{31} G. x. S. G）。由于该蛋白质在兔网织红细胞裂解物的体外翻译系统中不发挥切割功能，因此很难对该蛋白酶进行深入分析。然而，它在小麦胚的体外翻译系统中是有活性的，并且其切割位点在 TVMV 和 TEV 中均为 F 和 S 两个氨基酸之间。与其他马铃薯Y病毒属病毒的同源区域的比较表明，该酶的切割位点是保守的：在－1 的位置上是 F 或 Y，＋1 的位置上是 Q 或 H；在－2 位置上偏向于 Q 或 H，－4 位置上是 M 或 I。在大麦黄花叶病毒属病毒（bymoviruses）的 P1 和 P1-HC 之间看来没有间隔区。

HC-Pro 蛋白 C 端的 20 kDa 结构域具有酶活性，在 HC-Pro-P3 之间的接界处加以切割（Carrington *et al.*，1989a）。该蛋白酶的活性部位有半胱氨酸和组氨酸残基（Oh and Carrington，1989），因此类似于木瓜蛋白酶的半胱氨酸蛋白酶（papain-like cyste-

ine proteinase)。利用定点诱变和体外表达等实验研究了该蛋白酶的切割位点特异性。在G：G切割位点，－4、－2、－1和＋1是关键的位点，而－5、－3和＋2则不是(Carrington and Herndon，1992)。这些位点在蚜虫传播的马铃薯Y病毒属病毒中是保守的，而在真菌转播的大麦黄花叶病毒属病毒BaYMV中却不保守，即在－4和＋1的位置上分别有G/Y和S/G的替换（Shukla，1994)。

较小的核内含体蛋白（nuclear inclusion protein)，NIa，含有马铃薯Y病毒属病毒的主要的蛋白酶。它有两个结构域，其N端是与基因组连锁的蛋白质VPg（22 kDa)，而C端是蛋白酶（27 kDa)（Dougherty and Carrington，1988)。

NIa是经自我催化剪切从多聚蛋白上释放出来，然后催化切割各个蛋白接界处释放出P3、$6K_1$、CI、$6K_2$、NIb和CP等成熟的蛋白质产物。VPg结构域从NIa蛋白质上切割下来的效率要低得多。定点诱变实验的数据表明TEV的49 kDa蛋白酶的催化性三联体氨基酸可能是His234、Asp269和Cys339（Dougherty *et al.*，1989b)。该模体在所有的马铃薯Y病毒属病毒中都存在。

数种病毒的切割位点已经被鉴定出来（表7.3)，据认为所有的马铃薯Y病毒属病毒中都存在模体V-X-X-Q/（A、S、G或V)，其中QS、QG和QA是最重要的切割位点。该模体因病毒的不同而有一些变化（表7.3)。并且从NIa蛋白释放出VPg的位点与其他位点有明显差异。

表7.3 马铃薯Y病毒属4个成员的NIa和HC-Pro蛋白酶以及大麦黄花叶病毒类似NIa的蛋白酶切位点已证明的及推导的切割位点的氨基酸序列

HC-Pro[a]	PPV YLVG/GL	TEV YVVG/GM	TVMV YKVG/GL	PVY YRVG/GV	BaYMV
A	QVVV**HQ**/S	EDVLE**Q**/A	EIVE**FQ**/A	YDVR**HQ**/R	PKIV**LQ**/A
B	QAVQ**HQ**/S	EIIYTQ/S	NNVR**FQ**/S	YEVR**HQ**/S	ASYG**LQ**/A
C	ECVH**HQ**/T	ETIY**LQ**/S	EAVR**FQ**/S	QFVH**HQ**/A	
D	EEVV**HQ**/G	EPVY**FQ**/G	EPVK**FQ**/G	ETVS**HQ**/G	
E	EFVYTQ/S	ELVY**SQ**/G	DLVRTQ/G	DVVVE**Q**/A	DIIH**MQ**/A
F	NVVV**HQ**/A	ENLY**FQ**/S	ETVR**FQ**/S	YEVN**HQ**/A	DEIW**LQ**/A
V	EEVDHE/S	EDLTFE/G	QEVAFE/S	QEVEHE/A	

注：a. HC-Pro与字母（A～F和V）代表的位点如图7.16所示。黑体的氨基酸表示各位点之间的相似处，而斜线"/"表示切割位点。经允许，引自Reichmann等（1992)。

由7个氨基酸残基组成的一个模体，E-X-X-Y-X-Q/（S或G)，存在于TEV的多聚蛋白之中（Carrington and Dougherty，1988)。除此之外，该多聚蛋白的加工速率还受到其他的病毒特异性模体的调控，这些模体包括：在－4位上的疏水性残基、＋1位点上除A、G或S外的其他残基，以及一些远离切割位点的残基。对切割位点的控制看来覆盖了至少－7～＋2位氨基酸这个区域（Shukla，1994)。

通过克隆及表达TuMV和TEV的蛋白质已详细地研究了该27 kDa蛋白酶的特性。TuMV的催化活性在15℃和pH 8.5的条件下达到最大（Kim *et al.*，1996)。TuMV和TEV的蛋白质的C端经加工形成的25 kDa蛋白质产物比27 kDa蛋白质的催化活性低

(Kim *et al.*，1995；Parks *et al.*，1995)。经第二次内部切割产生的 24 kDa 产物已在 TuMV 的蛋白质中鉴定出来（Kim *et al.*，1996)。产生 25 kDa 的切割位点是很罕见的，即在 TuMV 的丝氨酸（Ser）和甘氨酸（Gly）以及 TEV 的甲硫氨酸（Met）和丝氨酸（Ser）之间切割。而导致 TuMV 的 24 kDa 蛋白质的加工是在苏氨酸（Thr）和丝氨酸（Ser）之间的切割。该 25 kDa 蛋白质产物的蛋白酶活性很低，而 24 kDa 蛋白质没有（可检测到的）活性。

ii. 蛋白质的体内合成

前面已经讨论过一些体内发现的病毒蛋白质。Donofrio 等（1986）从 MDMV 侵染的玉米中分离到一种具有 RdRp 活性的物质。这种活性物质是可溶性的，据认为是一种分子质量约为 160 kDa 的蛋白质。该聚合酶的亚基结构还没有被研究清楚。Vance 和 Beachy（1984）在受 SMV 侵染的大豆叶的提取物中发现一个基因组长度的 RNA 能特异地与有活性的多核糖体相结合。他们认为该 RNA 就是在体内翻译的唯一的病毒 RNA。全长病毒 RNA、互补链以及病毒的双链 RNA 都能与组织提取液中的叶绿体组分结合在一起（Gadh and Hari，1986）。然而，还没有证据表明病毒 RNA 的合成可在叶绿体内发生。

c. 讨论

多聚蛋白加工的策略既有优点也有缺点。除了能克服非 5′端的起始密码子问题以外，这种策略还有其他优点：几个功能蛋白一起表达可以节省遗传信息，而且具有调节加工途径的潜力。这在 NIa 蛋白酶的切割位点的不同以及周围残基对切割速率的影响等方面得到了证明。同样，P1 蛋白质的切割分离之前需要 HC-Pro 的 C 端完成切割，这说明很可能存在着某种目前尚不清楚的调控机制。

该策略的主要缺点是很难看出马铃薯 Y 病毒属病毒的多聚蛋白基因组策略的效率。举个例子来说，TEV 外壳蛋白基因外壳蛋白位于基因组的 3′端（图 7.16），因此 TEV 每一个 20 kDa 外壳蛋白分子的产生都伴随着总计约为 320 kDa 的所有基因产物的翻译表达。由于每个病毒粒体的包裹需要大约 2000 个外壳蛋白分子，但复制一个病毒可能只需要一个复制酶分子，因此看来这是一个效率非常低的表达方式。事实的确如此，一些基因的大量产物都是以无功能的状态在受侵染的细胞中积累（参见第 3 章第Ⅳ节 C)。然而，马铃薯 Y 病毒属是一个适应力很强的群体。它含有许多成员并且它们的寄主范围很广。其他的病毒在利用这种多聚蛋白加工策略的同时还有其他的方法来避免该策略的不足。例如，豇豆花叶病毒属的病毒有两种外壳蛋白，在两个不同基因组片段上都存在一个外壳蛋白基因（参见第Ⅴ节 E. 8 部分)。因此，在这些病毒侵染的细胞中看来没有非外壳蛋白基因产物的大量积累。

2. 策略 2：亚基因组 RNA

亚基因组 RNA（sgRNA）是在病毒的复制过程中从含有多于一个可读框的基因组 RNA 上合成的，是 5′截短的（truncated）和 3′共末端的（co-terminal）基因组形式（versions of the genome)。这使原来在下游的可读框就变成位于 mRNA 的 5′端。当在基因组的 3′端有几个基因存在时，可能会产生一系列具有共同 3′端的（共线性的，col-linear）sgRNA，如 CTV sgRNA 嵌套（nested set）至少含有 9 个 sgRNA（Karasev

et al.，1997)。

亚基因组 RNA 可能被包裹于病毒粒体中（如 *Bromoviridae*，SHMV），因此在界定侵染性基因组（infectious genome）的构成时可能会有不确定性。这些 sgRNA 的包裹（encapsidation）主要依赖于这些 RNA 片段上具有装配起点（origin of assembly）并且包裹情况在同一属内的不同病毒，甚至一种病毒的不同株系之间都会有差异。例如，装配起点存在于 SHMV 外壳蛋白的亚基因组上，但在烟草花叶病毒属的其他病毒如 TMV 的相应的 sgRNA 上不存在（参见第 5 章第Ⅲ节 B.2 部分与第Ⅳ节 A.2.a 部分)。BaMV 的典型株系不包裹任何 sgRNA，而该病毒的 V 株系则包裹两个 sgRNA (Lee *et al.*，1998)。

a. 亚基因组 RNA 的合成

至今，至少已提出 4 种模型来解释如何从基因组 RNA 上合成 sgRNA。现分别简述如下：

(1) 在合成正链的过程中，从全长的负链的内部起始从头合成 sgRNA。

(2) 在合成正链的过程中，是用来自于基因组 RNA 5′端的一个短的前导序列 (short leader) 作为引物在全长负链上起始合成 sgRNA。在冠状病毒（coronaviruses）中已发现这种现象（Liao and Lai，1994）。

(3) 在合成负链的过程中，分子内的重组使复制酶从亚基因组 RNA 的起始位点跳跃到全长基因组的 5′端重新起始，以完成不完整负链的合成，再以此为模板合成亚基因组。在冠状病毒中也发现了这种现象（Sawiki and Sawiki，1998)。

(4) 在合成基因组负链期间合成提前终止（premature termination)，然后就利用此截短的新生 RNA 作为模板合成 sgRNA。

据认为，植物病毒主要采用第 1 种和第 4 种机制来产生 sgRNA。

b. 内部起始从头合成

内部起始从头合成（*de novo* internal initiation）的最简单模型的必要条件是复制酶能识别 sgRNA 的 5′端的上游序列。该序列称为亚基因组启动子（subgenomic promoter)。有关亚基因组启动子的很多工作是以 BMV 为材料进行的，但是已经在其他一些病毒上找到并精确定位了亚基因组启动子（如 CuNV，Johnston and Rochon，1995；PVX，Kim and Hemenway，1996)。

BMV 具有三分体的基因组，其中 RNA 1 和 RNA 2 是单顺反子的（monocistronic)，而 RNA 3（2114 nt）是双顺反子的（dicistronic)。RNA 3 下游的可读框编码外壳蛋白，它是从一个 sgRNA 即 RNA 4（876 nt）上翻译表达的（其基因组组构参见第 6 章第Ⅶ节 A.1 部分)。由于 RNA 3 和 RNA 4 具有相同的 3′端，并且 RNA 4 的 5′端定位于 RNA 3 的 1238 位核苷酸，因此，RNA 4 的亚基因组启动子可能在 1238 位核苷酸的上游区域，此处为基因间区（intergenic region)。

BMV 的亚基因组启动子包含一个“核心”启动子和数个增强子（enhancer）区域。“核心”启动子是能以低准确性在基底水平启动 sgRNA 合成的最小区域，而增强子区域能调节复制起始的准确性并控制 sgRNA 的产量。有充分功能的亚基因组启动子大约含有 150 个核苷酸。BMV 的核心启动子位于亚基因组起始位点上游的 20 个核苷酸残基（−20～+1）区域内（亚基因组起始位点定为+1，负数意为在该位点的 5′上游，如在

正链 RNA 上一样）（Marsh *et al.*，1988；French and Ahlquist，1988）。Siegel 等（1997；1998）通过构建含有核心启动子和模板并能够指导正链合成的“原录体”（前体）（proscript）研究了核心启动子的结构。通过诱变实验，他们发现－17、－14、－13和－11 位核苷酸对启动子的活性是必不可少的。一些证据表明－17 位核苷酸能够被 RdRp 所识别。＋1 和＋2 位核苷酸（胞苷酸与腺苷酸）对于 RNA 的合成也相当重要（Adkins *et al.*，1998)。此外，核心启动子能形成一个稳定的发夹结构（Jaspars，1998)。

通过体外实验，在 BMV 的启动子内发现了 3 个增强子区：保证精确起始的起始位点下游的 16 个核苷酸（＋1～＋16）以及两个上游结构域［所有雀麦花叶病毒属病毒（bromoviruses）都有的一个内部 poly（A）序列与一个 UUA 的 3 次重复序列（－38～－48)］（Marsh *et al.*，1988)。然而，体内实验分析表明核心区域向下游延伸即在－20～＋16，并且 poly（A）和使完整启动子延伸至起始位点上游－74～－95 的 AUC-UAUGUU 序列的 3 次重复都是必不可少的（French and Ahlquist，1988)。poly（A）序列的缺失导致了 3 个回复突变体的产生，即能恢复亚基因组 RNA 的合成（Smirnyagina *et al.*，1994)。其中两个回复突变体是在亚基因组启动子的位置发生了回复突变，并能提高基因组 RNA 3 的水平。就第三种回复突变体而言，突变的位置是在亚基因组启动子的上游称为 B 框的一个序列中，并且该回复突变能降低 RNA 3 的表达量。B 框是一种类似于 ICR2（内含子控制区 2）的序列，与细胞的 RNA 聚合酶Ⅲ、tRNA 中的 TΨU 环以及 BMV 的 RNA 1 和 RNA 2 的 5′端序列相似。

BMV 和 CCMV 的 RdRp 识别 BMV 的核心亚基因组启动子时均需要－17、－14、－13 和－11 位的特异性功能残基（Adkins and Kao，1998)。对 CCMV 的亚基因组 RNA 的合成而言，这两种病毒的 RdRp 除了需要上述核苷酸之外，还需要－20、－16、－15 和－10 位的功能核苷酸。其中－20 位的核苷酸对这两个启动子的差异识别是部分相关的。

AMV 的亚基因组启动子比 BMV 的更加复杂，尤其是在体内，这是因为：①亚基因组 RNA 4 是外壳蛋白的 mRNA，负链复制时需要此外壳蛋白；②基因间区域只有 49 个核苷酸，序列太短以致不能容纳该启动子。因此，启动子延伸到上游的移动蛋白基因（ORF 3a）的 3′端，从而影响了对启动子在体内进行突变分析。然而，通过在 sgRNA 的 5′端插入一个足够大的亚基因组启动子就可以用来研究该启动子的体内活性特点（van der Kuyl *et al.*，1990)。研究表明核心启动子位于－26 和＋1 之间，并且存在着两个增强子区域，分别位于下游（＋1～＋12）和上游（－136～－94)。AMV 和 BMV 的核心启动子均有一个小的共有序列（AAU)，突变实验表明该保守位点很重要（van der Vossen *et al.*，1995)。AMV 和 BMV 的核心启动子都能形成发夹结构（Jaspars，1998)，但是 AMV［以及等径不稳环斑病毒属病毒（ilarviruses)］的发夹结构更加稳定。研究表明，AMV 和等径不稳环斑病毒属病毒在复制时需要外壳蛋白促使聚合酶和核心启动子的发夹结构互作（参见第 8 章第Ⅳ节 G 部分）。

因此，AMV 和 BMV 都具有一个共同的空间结构和与侵染动植物的类似甲病毒属病毒（alphaviruses）的共有序列同源的一些保守序列（Ou *et al.*，1982)。

c. 负链合成的提前终止

亚基因组启动子的上游区与病毒核酸的其他区域的长距离的顺式或反式互作会造成负链合成的提前终止。导致提前终止的相互作用可以发生于产生亚基因组的同一个核酸分子上（顺式互作），也可以发生于多组分基因组的不同基因组片段上（反式互作）。

下面介绍 TBSV 和 PVX 通过顺式互作产生亚基因组 RNA 的情况（Miller *et al.*，1998；Zhang *et al.*，1998），以及 RCNMV 通过反式互作产生亚基因 RNA 的方式（Sit *et al.*，1998）。

TBSV 有 5 个可读框，3′端的 3 个可读框是通过两个亚基因 RNA（sg mRNA 1 和 sg mRNA 2）表达的（其基因组组构见图 6.23）。缺失突变鉴定出在 sg mRNA 2 起始位点的上游大约 1 kb 处的 12 nt 残基对于亚基因 RNA 的积累是必不可少的。该 12 nt 的序列有与 sgRNA 2 起始位点的 5′端序列配对的潜力，并且突变实验也支持这种解释。在不同的番茄丛矮病毒属病毒的基因组中也存在类似稳定性的和相对位置的碱基配对序列区域。有人提出，该上游序列代表了通过长距离 RNA-RNA 的互作而使亚基因 RNA 启动子活性提高的顺式作用元件。

PVX 的基因组表达 5 个蛋白质，聚合酶是直接从基因组 RNA 上表达的，而三基因块编码的移动蛋白和外壳蛋白是从两三个亚基因组 RNA 上表达的（其基因组组构见图 6.39）。这两个启动子的上游有一个保守的 8 nt（octanucleotide）序列（GUUAAGUU），并且该序列在马铃薯 X 病毒属内也是保守的（Kim and Hemenway，1997）。诱变实验表明该保守序列以及其离亚基因 RNA 合成的起始位点的距离对于亚基因组 RNA 的积累是至关重要的。其他诱变实验表明在基因组 RNA 的 5′端有多个元件对基因组和亚基因组 RNA 的积累都是很重要的（Kim and Hemenway，1996）。亚基因组 RNA 起始位点上游的保守序列在基因组 RNA 的 5′区域内也存在，而且突变与互补突变实验表明这两个位置的保守区域可以产生长距离互作（Kim and Hemenway，1999）。

RCNMV 的基因组分为两个 RNA 片段，RNA 1 是编码病毒聚合酶和外壳蛋白的双顺反子，而 RNA 2 为单顺反子［石竹病毒属病毒（dianthoviruses）的基因组组构见图 6.30］。外壳蛋白是由 RNA 1 的亚基因组 RNA 表达的，推定的上游启动子区域据预测可以形成一个稳定的茎-环结构（stem-loop structure）（Zavriev *et al.*，1996）。外壳蛋白 sgRNA 的表达离不开 RNA 2 的存在（Vaewhongs and Lommel，1995）。为了研究在亚基因组 RNA 的表达过程中 RNA 1 和 RNA 2 之间的相互作用，Sit 等（1998）用 GFP 基因取代了 RNA 1 上的外壳蛋白基因，结果表明亚基因组 GFP（sGFP）只有在 RCNMV（以及相关的病毒 CRSV 或 SCNMV 等）的 RNA 2 存在的情况下才能在体内表达。RNA 2 的突变很难进行，因为鉴定亚基因组表达的反式作用元件可能会干扰负责 RNA 2 复制的顺式作用元件。为了区分这些元件，利用了 TBSV 的侵染性克隆作为表达 RCNMV 的 RNA 2 片段的载体（表 7.4）。

用这种方法证明了 RNA 2 的 34 nt（756～789）片段是一个反式作用元件。该 34 nt 元件形成的一个茎-环结构在 RCNMV、CRSV 和 SCNMV 的 RNA 2 中都是保守存在的。并且，8 nt 的环与 RNA 1、RNA 2 的亚基因组 RNA 起始位点上游的核苷酸环的序列是互补的。在不改变重叠的聚合酶基因编码的氨基酸序列的条件下，RNA 1 上这

个 8 nt 序列的突变使得亚基因组 RNA 不能形成，而在 RNA 2 上该 8 nt 环的互补突变恢复了产生亚基因组 RNA 的能力。因此，RNA 2 上的 8 nt 组成的环能反式激活 RNA 1 上的亚基因组 RNA 的合成。基于这些发现，Sit 等（1998）提出了 RCNMV 亚基因组 RNA 形成的模型（图 7.17）。

表 7.4 通过 GFP 替代 RCNMV RNA 1 上外壳蛋白基因（R1sGFP）形成的亚基因组 RNA（sGFP）的表达依赖于 RNA 2 序列的实验

将 R1sGFP 与包含有 RCNMV RNA 2片段的 TBSV 复制子(pHST2的外壳蛋白区域被改造以接受外源基因，形成 sgRNA 后可表达外源基因)的转录物共同接种以界定最小的反式激活元件

构建物	RNA 2序列的位置	RNA 2插入序列的长度/nt	所产生的 sGFP [a]
RCNMV RNA 2	1～448	1448	+++
pHST2	—	—	—
pHST2-RC2.3	708～1031	324	+
pHST2-RC2.4	1031～708(反向插入)	324	—
pHST2-ΔBX	708～916	209	++
pHST2-707	707～837	121	+
pHST2-828	828～918	91	—
pHST2-SL2	756～789	34	+++
pHST2-TA38	792～755（反向插入）	38	—
pHST2-20	762～782	21	+
pHST2-LT2	767～775	9	—

注：a. 由 RNA 2 诱导的 sGFP 的产出：+++ = 100%；++ = 50%；+ = 25%；— =未检测到。经允许，引自 Sit 等（1998）。

在早期阶段，RNA 1 和 RNA 2 的复制量都很大。RNA 2 上的反式激活因子结合到 RNA 1 上以阻止复制酶形成该 RNA 的全长负链，从而得到截短的负链。由于基因组 RNA 1 和亚基因组 RNA 的 5′端序列是保守的（图 7.17），因此截短的负链 RNA 可能作为模板合成正义的亚基因组 RNA。

d. 讨论

sgRNA 的利用作为克服真核翻译系统限制的一个策略在植物病毒中是广泛存在的（表 7.7）。看来亚基因组 RNA 的产生有两种机制，二者都涉及与病毒复制的密切连锁并且均有一些人们刚开始认识的很强的调控系统。亚基因组启动子在基因间区域和编码区都可能存在一些元件，而且后一种情况说明启动子的位置也可能调控启动子的表达。上述几个例子已经表明 sgRNA 的启动子区域预测能形成稳定的二级结构（通常是茎-环结构）。根据预测其他病毒如 TCV 也含有这种二级结构（Wang and Simon，1997；Wang *et al.*，1999）。

3. 策略 3：多分体基因组

具有多分体基因组（multipartite genome）的病毒把在病毒侵染循环中需要的信息

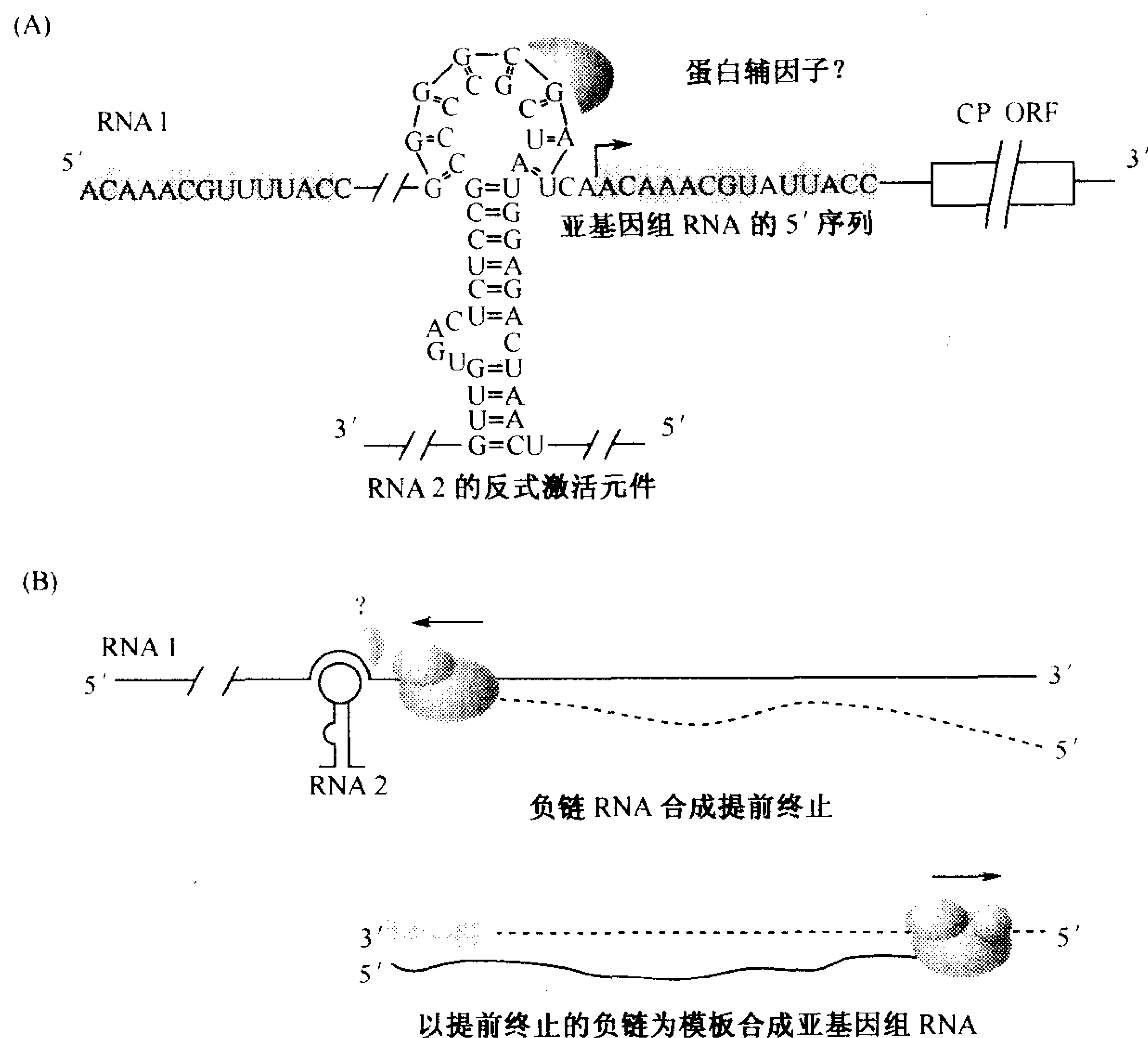


图7.17　红三叶草坏死花叶病毒(RCNMV)反式激活机制的构成和模型。(A)参与反式激活的序列。加灰影的核苷酸表示在基因组 RNA 1和亚基因组 RNA 间保守的序列，可能是正链的启动子。34 nt 组成的反式激活因子的环区与互补的8 nt 的元件配对，位于 RNA 1上的 sgRNA 起始位点(右拐角箭头所示)上游两个核苷酸处。(B) sgRNA 产生的模型。互补链由虚线表示。承蒙版权所有者(The American Association for the Advancement of Science)惠允，引自 Sit 等(1998)。

组分成两个或多个核酸片段。植物的 DNA 病毒和 RNA 病毒中都存在这样的情况。对于正义的 ssRNA 病毒而言，该策略把基因放在每一个 RNA 片段的 5′端，因而可直接进行翻译。

在 70 个植物病毒属中，28 个有多分体基因组（见附录 2）。其中大多数病毒的基因组片段分别包裹于不同的粒体中，这样的病毒叫多分体（多成分）（multicomponent）病毒。呼肠病毒科（*Reoviridae*）和双分病毒科（*Partitiviridae*）的病毒成员均将其所有的基因组片段装到一个粒体里。

4. 策略 4：内部起始

翻译起始于内部核糖体进入位点（internal ribosome entry site，IRES）或核糖体着陆点（ribosome landing pad），而不是 5′的 AUG 起始密码子（Belsham and Sonenberg，1996）。IRES 可能形成一个复杂的二级或三级结构以使核糖体和反式激活因子结合。现在有很多关于植物病毒的双顺反子 RNA 的下游 ORF 得以表达的报道（Heffer-

on *et al.*, 1997)，但是很少能够完全归结于内部起始。

然而，十字花科植物上的 TMV（crTMV）的外壳蛋白的亚基因组 mRNA，I_2RNA，即 crTMV 与 TMV 的 U1 株系的移动蛋白的 mRNA 都是通过内部起始表达的（Ivanov *et al.*, 1997; Skulachev *et al.*, 1999)。这些 RNA 片段都没有帽子结构并且具有很长的 5′端的非翻译区（UTR）（crTMV 外壳蛋白和移动蛋白的 mRNA 的 UTR 长度分别是 148 nt 和 228 nt)。问题是如何证明一个在体外发生内部起始的 RNA 是否在体内也是如此。Skulachev 等（1999）获得了这种机制在体内发生的有力证据，因此解除了这一疑问。通常认为，IRES 策略能使潜在低效率的 mRNA（无帽子和具有长的 5′ UTR）的翻译更加有效，并且还可能提供翻译调控以便使一些基因产物如移动蛋白能够在适当的时间合成。

5. 策略 5：渗漏扫描

渗漏扫描是指 40S 核糖体亚基从 RNA 的 5′端开始扫描，但是并不是都从第一个 AUG 开始翻译。有些（或所有）核糖体会略过第一个 AUG，而从下游的 AUG 开始翻译。在某些情况下，80S 核糖体的 40S 亚基在终止密码子的位置不离开 RNA 链，在一个下游的起始密码子又重新起始翻译。

有 3 种形式的渗漏扫描：①在一个可读框内有两个起始位点；②重叠的可读框；③两个连续的可读框（Fütterer and Hohn, 1996; Maia *et al.*, 1996)。

a. 一个可读框内有两个起始位点（双起点）

CPMV 的基因组由两种 RNA 组成，较短的 M-RNA 编码两个 C 端共线性的多聚蛋白（105 kDa 和 95 kDa)，起始于两个符合读框（同相）的 AUG 起始密码子（CPMV 的基因组组构见图 6.18)。

根据体外翻译实验结果提出了可能存在内部起始的现象（Thomas *et al.*, 1991; Verver *et al.*, 1991)，但是体内实验表明更有可能是涉及了渗漏扫描（Belsham and Lomonossoff, 1991)。渗漏扫描机制的参与得到了下述事实的支持：95 kDa 蛋白质的 AUG 所处的（前后）序列环境（在－3 和＋4 位上均为 G）比 105 kDa 蛋白质的 AUG（－3 和＋4 位上分别是 A 和 U）更加利于翻译。

b. 重叠的可读框

黄症病毒属（*Luteovirus*）和马铃薯卷叶病毒属（*Polerovirus*）的病毒成员的基因组含有 6 个可读框，并且位于 3′端的可读框都是通过 sgRNA 来表达的（图 6.35)。ORF 4（17 kDa）存在于另一个可读框（ORF 3)（外壳蛋白基因）的内部。ORF 4 的翻译就是通过 ORF 3 翻译起始的渗漏扫描而实现的（Tacke *et al.* 1990; Dinesh-Kumar and Miller, 1993)。ORF 3 的 AUG（－3 位是 U、＋4 位是 A）的前后序列环境不太适合翻译起始。并且这两个可读框的翻译还存在着相互作用。如果不改变 ORF 3 AUG 的侧翼碱基，则降低 ORF 4 的起始频率的突变也会降低在 ORF 3 的 AUG 起始的频率（Dinesh-Kumar and Miller, 1993)。

PCV 的 RNA 2 上有两个重叠的可读框也是通过渗漏扫描来翻译的（Herzog *et al.*, 1995)。马铃薯 X 病毒属、香石竹潜隐病毒属、真菌传杆状病毒属和大麦病毒属的病毒的三基因块（triple gene block）移动蛋白复合体（参见第 9 章第 Ⅱ 节 D.2.f 部分）

的后两个ORF也是通过类似的渗漏扫描机制表达的（Zhou and Jackson，1996；Verchot *et al.*，1998）。上游的AUG通常位于欠佳的前后序列之中，并且在3个读框的任一个中上游的ORF几乎不包含其他的AUG，这些情况是渗漏扫描产生的必要条件。

c. 两个连续的可读框

PCV有一个二分体的基因组，其中RNA 2有5个可读框（ORF）（其基因组组构见图6.47）。RNA 2的5′端ORF编码外壳蛋白，并且与下一个ORF（39 kDa蛋白质）有两个核苷酸残基的重叠。两个ORF由同一个RNA上翻译表达。编码外壳蛋白的ORF的620 nt残基除了起始的密码子之外，不包含任何其他的AUG密码子。在该启动密码子的上游插入茎结构或者加入AUG密码子抑制了39 kDa蛋白质的翻译，该实验表明存在渗漏扫描（Herzog *et al.*，1995）。

RTBV的ORF 1、ORF 2、ORF 3的表达是由于上游区域中缺乏AUG密码子而利用渗漏扫描方式的另一个例子（参见本章第Ⅴ节H.1.b部分）。

d. 讨论

非5′端的可读框通过渗漏扫描翻译通常是由于上游可读框的AUG起始密码子处于欠佳的前后序列环境中。上游没有或缺少AUG密码子时能增强该效应。然而，用体外翻译的信息作为渗漏扫描的机制存在的证据时，必须加以小心。一些参数如翻译体系和条件，尤其是二价阳离子的存在会影响非5′端的可读框的表达。

6. 策略6：非AUG起始密码子

一些病毒的可读框的起始不是从传统的AUG密码子开始的，并且这些可读框的起始效率不高。

RTBV的基因组是从转录于病毒DNA的一个长于基因组长度（more-than-genome length）的RNA上表达的（参见本章第Ⅳ节D部分）。对该RNA序列的计算机分析表明上面的3个常规的可读框（conventional ORF）起始于AUG并且结束于一个终止密码子，另外一个区域缺少终止密码子和AUG密码子。利用诱变和一个偶联的氯霉素乙酰转移酶（chloramphenicol acetyl transferase，CAT）基因的表达，Fütterer等（1996）证明该区域（ORF I）是可以得到翻译表达的，而且翻译是从AUU密码子起始的（图7.18）。该密码子起始的翻译效率是传统的AUG起始密码子的10%左右。

SBWMV也具有二分体基因组，其中RNA 2有3个可读框（ORF）：外壳蛋白（19 kDa）基因、自外壳蛋白基因的通读ORF（readthrough ORF）和一个3′端的、通过一个亚基因组RNA表达的ORF（19 kDa）（其基因组组构见图6.46）。除此之外，RNA 2还能分别在体外和体内表达出一个能与SBWMV外壳蛋白的抗血清进行反应的28 kDa蛋白质（Hsu and Brakke，1985；Shirako and Ehara，1986）。

体外翻译和定点诱变实验表明该28 kDa蛋白质是以CUG密码子起始翻译的。CUG密码子位于19 kDa的外壳蛋白的AUG密码子的上游并且与AUG符合读框，导致外壳蛋白的N端上延伸出40个氨基酸形成28 kDa蛋白质（Shirako and Wilson，1993；Shirako 1998）。

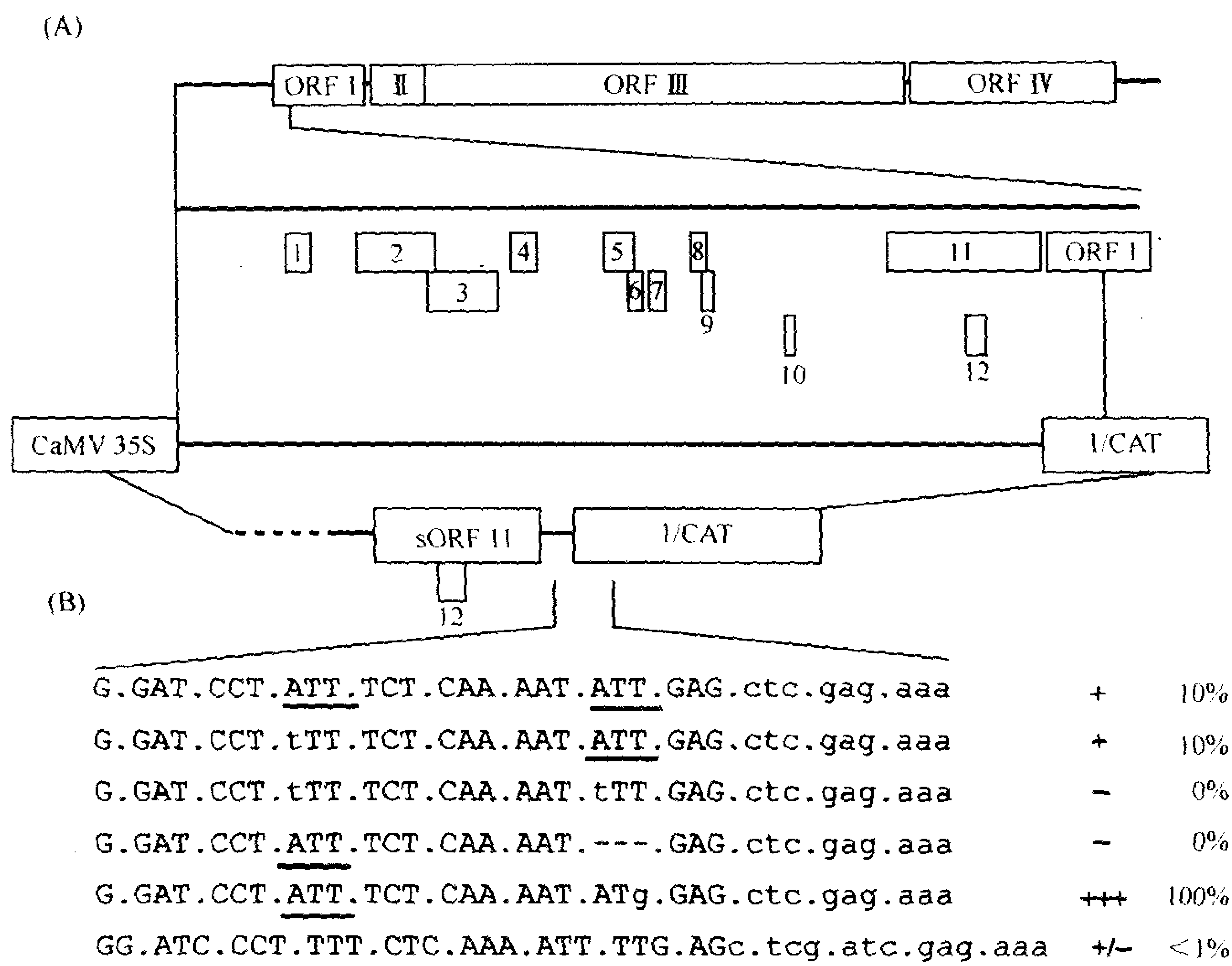


图7.18 Fütterer 等(1996)证明 RTBV 的非 AUG 起始密码子的实验示意图。(A)顶部线条代表线性化的 RTBV 基因组组构，长方框表示各个 ORF。中部的线条为标有编号的12个 ORF 的基因组5′端的放大图。底线表示在水稻细胞中瞬时表达的基本构建物(basic construct)的结构。由 CaMV 35S 启动子驱动转录，缺失 AUG 起始密码子的氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因与 ORF Ⅰ以符合读框(in frame)的方式融合。(B)各种构建物中 ORF Ⅰ的5′端的前后序列。RTBV 的序列用大写而 CAT 序列以小写字母表示。RTBV 序列的突变处用小写或者"-"表示。两个 ATT 密码子用下画线标出。右边的+、-号表示 CAT 的相对活性，最右侧的%则表示相对于保留了 CAT 基因 ATG 起始密码子的构建物的 CAT 活性。

7. 策略 7：反式激活（Fütterer and Hohn，1996）

CaMV 的 dsDNA 基因组有 6 个距离很近的功能性可读框（closely-spaced functional ORF）（Ⅰ～Ⅳ）（参见第 6 章第Ⅳ节 A 部分），并且能够转录分别产生大于基因组的 RNA 即 35S RNA 和可读框Ⅵ的一个 mRNA（19S）（参见第Ⅳ节 D 部分）。

尽管一些证据表明一些可读框的表达是利用剪接的 RNA（spliced RNA）来表达的（参见第Ⅴ节 B.11 部分），但是有些可读框可能是从长的 RNA 上表达的。除非可读框Ⅵ的表达产物存在，否则许多下游的可读框在原生质中或转基因植物中不表达或很少表达（Bonneville *et al.*，1989；Fütterer and Hohn，1991）。

可读框Ⅵ的基因产物被称为反式激活因子（transactivator，TAV）并且据认为能促进翻译的内部起始。在分析 FMV 的基因产物时也发现有类似功能的蛋白质产物（Gowda *et al.*，1989；Scholthof *et al.*，1992a，1992b）；可能所有的花椰菜花叶病毒属病毒的基因组上的同一个相对位置上都可能有该功能的基因。

利用人工合成的多顺反子 RNA，Fütterer 和 Hohn（1991；1992）研究了调节反式激活的参数。他们的实验结果表明在下游的可读框重新起始的条件是不能存在长的可读框的重叠，并且在距第一个可读框大约 30 个密码子时特别有效。插入一个茎-环结构产生的极性效应可能会抑制核糖体转位到多顺反子 mRNA 中，并且对非重叠的 ORF 的特异性表明反式激活能增强核糖体的重新起始。距第一个可读框 30 个密码子的最佳长度正好足以从正在翻译的核糖体下露出来，因而说明反式激活因子可能直接或间接地作用于正在翻译或正在终止的核糖体上。

反式激活的功能位于反式激活因子（TAV）蛋白中心的 1/3 处（De Tapia *et al.*，1993）。利用该基因产物的这一最小核心部分（mini TAV），在转染的（transfected）细胞中必须多用 100 倍的 DNA 才能产生正常的反式激活水平。该反式激活因子核心片段（mini-TAV）只在野生烟草（*Nicotiana plumbaginifolia*）的原生质体中才有活性，而全长 TAV 能在很多双子叶和单子叶植物的原生质体中有活性。在 TAV 蛋白上 mini-TAV 之外有一个 RNA 结合活性区域，可能提高 TAV 在 RNA 附近的浓度。覆盖结合分析（overlay binding assay）表明，TAV 能与聚核糖体（polysome）结合，并且能与植物和酵母体内 18 kDa 的核糖体蛋白或核糖体相关蛋白质结合（Fütterer and Hohn，1996）。它也能够与拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的 60S 核糖体亚基 L18 蛋白质（RPL18）相互作用（Leh *et al.*，2000），并且作用区域是在 mini-TAV 所在的区域。

利用烟草属（*N. edwardsonii*）的原生质体，Edskes 等（1996）分析了不同花椰菜花叶病毒属病毒的 TAV 在激活基于病毒 RNA 的报道基因构建物的活性。他们发现植物细胞中多顺反子以及单顺反子病毒 mRNA 的表达需要可读框Ⅵ、翻译的 TAV 和 mRNA 的 3′端的同源顺式元件（cognate *cis*-element）三者的相互作用。

TAV 在转基因植物中的表达可以产生类似病毒病的症状（参见第 10 章第Ⅲ节 E. 6 部分）。目前还不了解该基因产物的反式激活还是其他活性导致这种症状的出现。

8. 策略 8：翻译（核糖体）转轨

短的可读框（sORF）（人为定义为短于 50 个密码子并且产物的功能未知的 ORF）在前导序列中会干扰下游可读框的翻译。在翻译的核糖体转轨（ribosome shunting）机制中，起始扫描的核糖体直接从供体位点被转移到受体位点（acceptor site），不必进行居间区域的线性扫描，因此可避开 sORF 的干扰。

植物副反转录病毒即花椰菜花叶病毒科的成员的 35S RNA 就有一个长且复杂的前导序列（图 7.19）。该前导序列长 350～750 nt，含有 3～19 个 sORF。它们折叠成复杂的茎-环结构（Pooggin *et al.*，1999）。提出的翻译转轨机制可以越过那些对翻译的束缚，使翻译顺利通过（Fütterer *et al.*，1993）。翻译转轨需要转轨供体位点与受体位点以及使其聚在一起完成转轨的清楚结构。许多有关这些特点的研究都是以 CaMV 为材料进行的。

CaMV 35S RNA 的前导序列形成一个伸展的发夹构象，它包含长距离的假结（pseudoknot）和二聚体（Hemmings-Mieszczak *et al.*，1997）。化学修饰，酶学研究以及温度梯度电泳等实验表明发夹由 3 个称为茎段（stem section）Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ的元件组成（Hemming-Mieszczak *et al.*，1997；1998）。茎段Ⅰ是最稳定的，并且其结构而非序列对核糖体转轨而言是非常重要的（Hemmings-Mieszczak and Hohn，1999）。

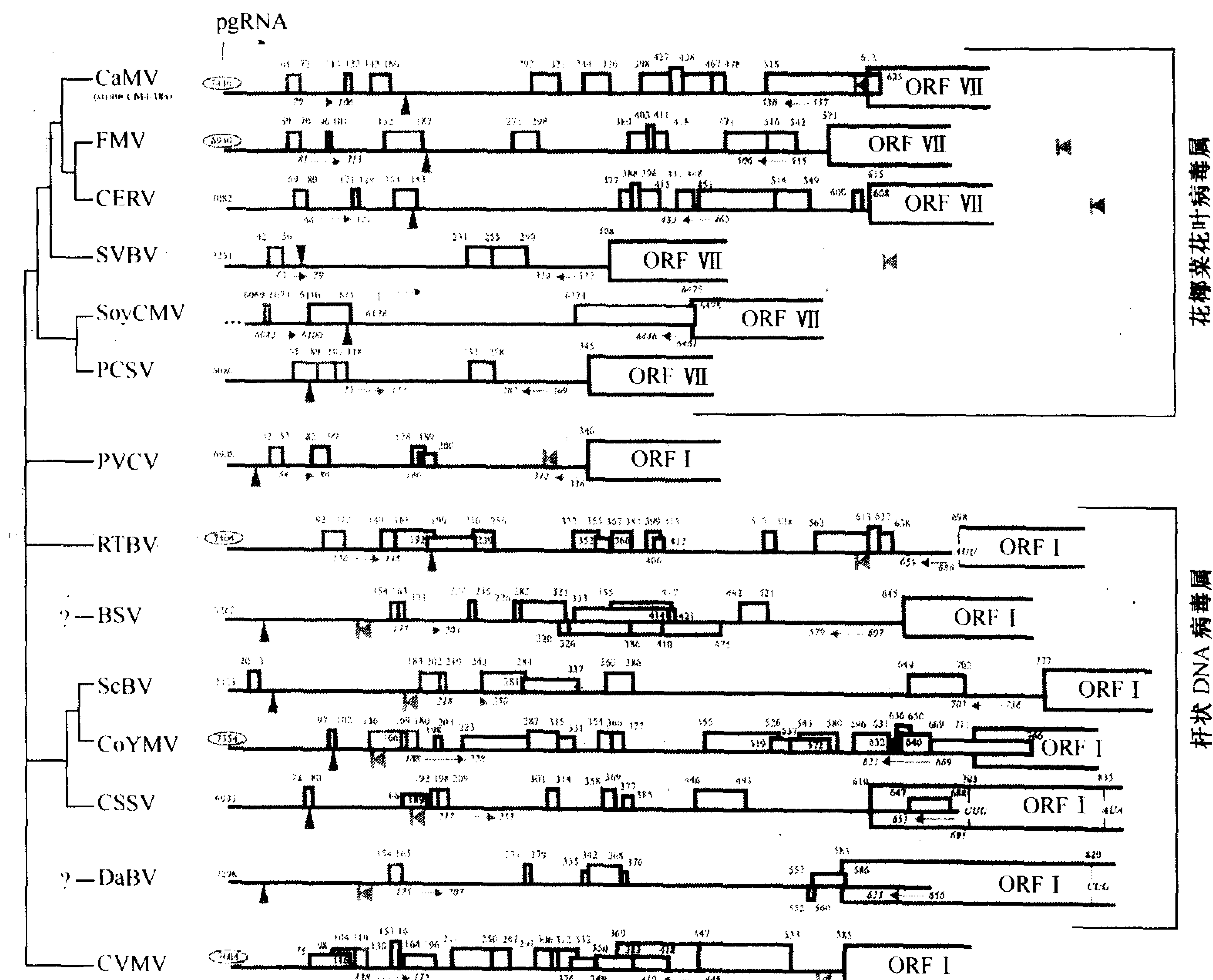


图7.19 （见彩色图版7.1）多种植物副反转录病毒前基因组(pg)RNA的前导序列一级结构的比较。左侧的系统进化树说明各种病毒反转录酶间的关系（根据 Richert-Pöggeler 和 Shepherd，1997；注意在比较时 BSV 和 DaBV 未包括在其中）。花椰菜花叶病毒属成员(caulimoviruses)和杆状 DNA 病毒属病毒(badnaviruses)各归为一个组群(右边所示)。第一个长的 ORF（ORF Ⅶ或 ORF Ⅰ）前的前导序列用粗线表示。方框代表各 ORF，垂直线表示内部起始密码子。pgRNA 5′端标注数字的基因组位置如果已用引物延伸法定位则放在椭圆内，如果是推定的(putative)位置就不标椭圆。前导序列内的编号从5′端开始计数(SoyCMV 除外，其5′端尚不清楚)。前导序列下面的红色箭头表示可形成大茎-环结构基部的互补序列，该结构前的保守的小 ORF(sORF)也用红色表示。绿三角形代表了推定的或在 CaMV、FMV 和 RTBV 中已定位的 poly(A)信号(Rothnie *et al.*，1996)。靠近垂直线的箭头(蓝色)表示反转录时引物结合位点的位置。经允许，引自 Pooggin 等(1999)。

为了研究前导序列中 sORF 的影响，Pooggin 等（1998）突变了每一个 sORF 的起始密码子并测定了突变体的侵染性。5′端的 sORF（A）的突变会引起发病症状的延迟，并且突变体可以发生回复突变；位于茎-环中间的 sORF 具有侵染性的突变体，可能是发生了回恢复突变或者有互补的突变恢复了原来的结构。因此，sORF（A）以及位于发夹 3′端的多聚嘧啶序列（Hemming-Mieszczak and Hohn，1999）对于通过转轨刺激翻译都是至关重要的。转轨结构（shunt structure）的最新解释如图 7.20 所示。

核糖体必须先进入 5′端的帽子位点，随后转移到 sORFA 的位置，转轨越过稳定的发夹结构并最终到达第一个真正的 ORF。哺乳动物的 *AdoMetDC* RNA 的 sORF MAGDIS 能有条件地抑制下游 ORF 的重新起始（re-iniation）从而阻止转轨过程，说明了在

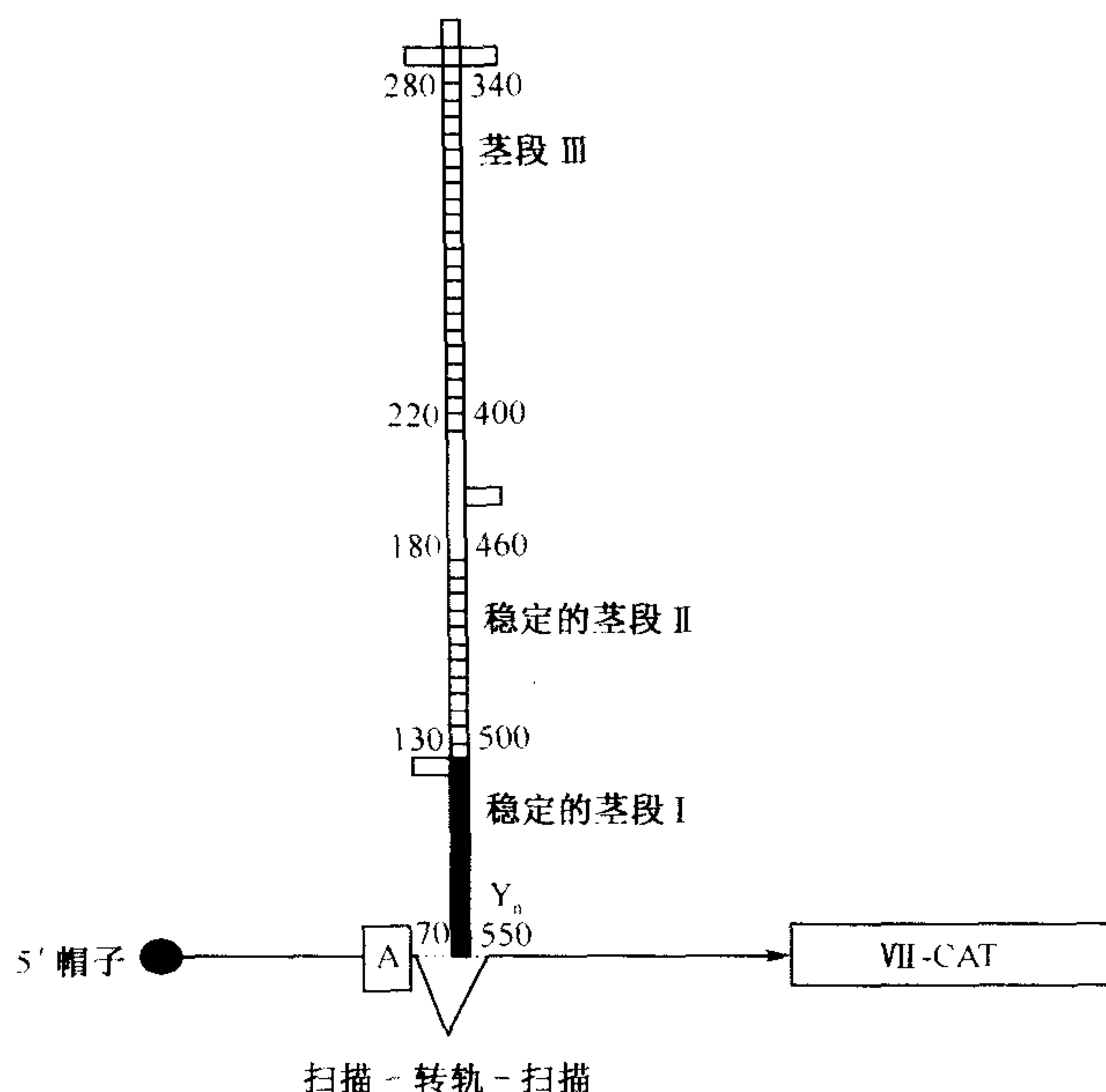


图7.20 CaMV 35S RNA 前导序列起始翻译期间核糖体的非线性迁移(核糖体转轨)。此前导序列表现为与一个延长的发夹结构(70～550位核苷酸)毗邻的非结构化的5′端和3′端区域组合的示意图。具有不同稳定性的3个茎段被标记,数字代表了其大致的边界:茎段Ⅰ(70～130位和500～550位核苷酸),茎段Ⅱ(130～180位和460～500位核苷酸)以及茎段Ⅲ(220～280位和340～400位核苷酸)。稳定的发夹结构(茎段Ⅰ,黑框)的存在通过核糖体转轨机制启动了一个下游ORF(Ⅶ-CAT)的翻译;所有必需的元件均用黑体表示:如5′帽子、sORF A(框中的A)、稳定的茎段Ⅰ以及富含嘧啶的、大约500 nt的序列(Y_n)。5′和3′单向的核糖体移动由的粗黑箭头表示(见下面的描述)。发夹前后紧邻的序列分别称做转轨供体(shunt donor)和转轨受体(shunt acceptor)位点。这一模型推测,在依赖于帽子的起始扫描之后,核糖体的40S亚基在翻译sORF A时,从转轨供体位点被转移至转轨受体位点,在此处使核糖体恢复扫描并继续前进。然后在ORF Ⅶ的起始密码子处,80S核糖体进行装配并开始翻译。经允许,引自Hemmings-Mieszczak等(1998)。

CaMV 中，转轨过程涉及了重新起始（Ryabova and Hohn，2000）。但是，至今还不知道发生于 sORF A 位置上详细作用过程和转轨接合部的实际跨越情况。

在 CaMV 中，转轨“供体”（donor）或“起飞”（take-off）位点是在 sORFA 的下游临近位置（Dominguez *et al.*，1998），而转轨的“受体”（acceptor）或“着陆”（landing）位点在 ORF Ⅰ的上游附近（Fütterer *et al.*，1993）。

在一项有关 CaMV 的前导序列对下游的 *uid*A（GUS）报道基因表达的影响研究中，Schärer-Hernández 和 Hohn（1998）发现在植物中（*in planta*），与没有前导序列的构建物相比，这种具有前导序列的结构发生转轨机制的平均效率是前者的 5%。然而，人们对利用这些植物系统（*in planta* system）去检验那些本质上的人工构建物的做法还有保留（疑问），因为有可能发生自然系统不发生的 RNA 加工、转运和修饰等过程。Dominguez 等（1998）建立的一种体外系统（*in vitro* system）避免了这些不足之处，并且能支持上述的体内研究得到的数据。尽管如此，如上所述，在从体外数据推断体内的实际情况时仍然必须有一定的保留态度。

利用紫外线交联法（UV cross-linking assay）已鉴定了能够结合 CaMV 的前导序列中数个位点的三种细胞蛋白质（Dominguez *et al.*，1996）。其中，p35 非特异地结合 RNA、p49 低特异性结合 RNA，但是 p100 与病毒序列特异性地互作。这 3 个蛋白质的表达并不受病毒的侵染所诱导。

在 RTBV 中也存在这种翻译转轨机制，其中转轨供体位于 sORF 1 附近而转轨受体在 ORF 1 的 AUU 起始密码子的附近（Fütterer *et al.*，1996）（参见第Ⅴ节 H. 1. b）。

9. 策略 9：通读蛋白质

5′端基因的终止密码子有可能是渗漏性的（leaky），使一定比例的核糖体继续翻译至下游的另一个终止密码子产生第二个较长的功能性多肽。这种现象称为“通读”（readthrough）或“终止密码子抑制”（stop-codon suppression），结果形成的蛋白质的 N 端部分（N-terminal portion）与上游的蛋白质序列相同，而 C 端部分是独特的。

通读策略至少在 17 个植物病毒属中存在（表 7.5），并且是黄症病毒科（*Luteoviridae*）的 3 个属和番茄丛矮病毒科（*Tombusviridae*）的大多数属的特点。这些通读产生的蛋白质可能是复制酶或者是参与介体传播的由外壳蛋白延伸的通读蛋白质（luteoviruse）（参见第 11 章第Ⅲ节 H. 1. a）。

表 7.5　通读密码子或终止密码子

科	属	病毒	通读终止密码子	通读蛋白
番茄丛矮病毒科（*Tombusviridae*）	番茄丛矮病毒属（*Tombusvirus*）	TBSV	AAA **UAG** GGA GGC	复制酶
	绿萝病毒属（*Aureusvirus*）	PoLV	UAC **UAG** GGG UGC	复制酶
	燕麦病毒属（*Avenavirus*）	OCSV	AAA **UAG** GGG UGC	复制酶
	香石竹斑驳病毒属（*Carmovirus*）	CarMV	AAA **UAG** UUG GAA	复制酶
	玉米褪绿斑驳病毒属（*Machlomovirus*）	MCMV 1	AAA **UAG** GGG UGU	复制酶
		MCMV 2	AAC **UGA** GCU GGA	未知
	烟草坏死病毒属（*Necrovirus*）	TNV	AAA **UAG** GGA GGC	复制酶
	黍花叶病毒属（*Panicovirus*）	PMV	AAG **UAG** GGG UGU	复制酶
黄症病毒科（*Luteoviridae*）	黄症病毒属（*Luteovirus*）	BYDV	AAA **UAG** GUA GAC	外壳蛋白延伸
	马铃薯卷叶病毒属（*Polerovirus*）	PLRV	AAA **UAG** GUA GAC	外壳蛋白延伸
	豌豆耳突花叶病毒属（*Enamovirus*）	PEMV	CUC **UGA** GGG GAC	外壳蛋白延伸
未归科的悬浮属	甜菜坏死黄脉病毒属（*Benyvirus*）	BNYVV	CAA **UAG** CAA UUA	外壳蛋白延伸
	真菌传杆状病毒属（*Furovirus*）	SBWMV RNA 1	AAA **UGA** CGG UUU	复制酶
		SBWMV RNA 2	AGU **UGA** CGG GAC	外壳蛋白延伸
	花生丛簇病毒属（*Pecluvirus*）	PCV RNA 1	AAA **UGA** CGG UUU	复制酶
	马铃薯帚顶病毒属（*Pomovirus*）	BSBV RNA 1	AAA **UGA** CGG	复制酶
		BSBV RNA 2	GAA **UAG** CAA UCA	外壳蛋白延伸
	烟草花叶病毒属（*Tobamovirus*）	TMV	CAA **UAG** CAA UUA	复制酶
	烟草脆裂病毒属（*Tobravirus*）	TRV	UUA **UGA** CGG UUU	复制酶

数据引自 Fütterer 和 Hohn（1996），经过修订与更新。

在通读过程中，终止密码子由抑制型 tRNA（suppressor tRNA）识读，而不是真核生物的释放因子复合体（release factor complex）所释放的核糖体识读。实际上，释放因子复合体与抑制型 tRNA 之间存在着相互竞争。主要有两个因素参与了终止密码子的通读，即终止密码子所处的前后序列环境和所涉及的抑制型 tRNA。

a. 终止密码子的前后序列

终止密码子具有不同的终止效率（UAA>UAG>UGA），并且终止密码子 3′的第一个、可能还有第二个核苷酸是重要的效率决定因子（Stansfield *et al.*，1995）。从表 7.5 可以看出琥珀（amber，UAG）和乳白（opal，UGA）终止密码子均可被通读，但是至今还没有天然的赭石（ochre，UAA）终止密码子被通读的例子。

然而，当 TMV 的可抑制的 UAG 密码子由 UAA 密码子取代，该病毒仍然能够复制并产生成熟的病毒粒体（Ishikawa *et al.*，1986）。与反转录病毒（retrovirus）不同的是，在植物系统中对终止密码子的抑制不要求特殊的结构特征。TMV 的 126 kDa ORF 末端的琥珀终止密码子的前后序列已得到详细研究，实验中插入了含有 GUS 或其他基因的构建物以使通读蛋白质能够在原生质体中定量（Valle *et al.*，1992）。该实验方法确定了(C/A)(A/C)A. UAG. CAR. YYA(R ＝嘌呤，Y ＝嘧啶）是对通读最适宜的共有序列（Skuzeski *et al.*，1991；Hamamoto *et al.*，1993）。有效地得到识别的终止密码子通常在紧邻该密码子的下一个核苷酸残基是一个嘌呤，并避免出现一个 C 残基（Fütterer and Hohn，1996）。

然而，表 7.5 的分析表明植物病毒中已鉴定的通读的终止密码子不一定符合由体外系统确定的前后序列环境。既然一些前后序列环境与上述情况有差别，番茄丛矮病毒科（*Tombusviridae*）和黄症病毒科（*Luteoviridae*）的许多病毒中的 UAG. G 的通读说明可能存在着另一个不同的机制。

有可能在这些通读位点下游的 12～21 个碱基处需要附加的一些顺式作用序列如保守的 CCCCA 模体或重复的 CCXXXX 模体等（Fütterer and Hohn，1996；Miller *et al.*，1997）。可能其他的一些长距离的相互作用也与实验中确定的 TMV 的最优前后序列环境的偏差有关。

b. 抑制型 tRNA

通读蛋白质的合成主要依赖于有适当的抑制型 tRNA 的存在。因此，烟草植株中有两种正常的 $tRNA^{tyr}$ 能在 TMV RNA 的体外翻译中促进 UAG 的通读（Beier *et al.*，1984a)。$tRNA^{tyr}$ 必须有一个合适的反密码子（anticodon）即 GΨA，才能允许有效的通读。来自麦胚的一种 $tRNA^{tyr}$，其反密码子不同于烟草中的反密码子，因而是低效的（Beier *et al.*，1984b)。

$tRNA^{gln}$ 也能抑制 UAG 终止密码子（Grimm *et al.*，1998）。目前已经发现各种抑制型 tRNA 可以抑制 TRV 的 UGA 终止密码子（Zerfass and Beier，1992；Urban and Beier，1995；Baum and Beier，1998）；叶绿体（chl）和细胞质（cyt）中的色氨酸专化性的 tRNA 的反密码子是 CmCA；叶绿体和细胞质中的半胱氨酸专化性的 tRNA 的反密码子为 GCA，而精氨酸的 tRNA 的同功受体（isoacceptor）的反密码子为 U＊CG。有意思的是，叶绿体的 $tRNA^{trp}$ 比细胞质的 $tRNA^{trp}$ 对 UGA 的抑制更加有效。

TRV 的一些株系的复制与线粒体有关（图 8.18），并且有可能在叶绿体中存在的

类似原核系统的 tRNA 也会存在于线粒体中。烟草叶绿体内的 $tRNA^{cys}$ 同功受体对 TRV 和 TMV 中的 UGA 终止密码子比细胞质受体（cytoplasmic acceptor）更能有效地通读（Urban and Beier，1995）。

c. 通读的比例

所产生的通读蛋白质的比例可能受到终止密码子前后序列的调控（Bouzoubaa *et al.*，1987；Miller *et al.*，1988b；Brown *et al.*，1996）、长距离效应以及抑制型 tRNA 等因素的调节。因此，体外实验得到的数据可能不会完全符合体内的情况。但是，有理由认为，在核糖体到达可抑制的终止密码子时，有 1%～10%的概率会发生通读。

d. 讨论

病毒不但可以克服真核翻译系统的束缚，而且能够利用终止密码子的通读来控制基因产物的表达。传播辅助因子（transmission helper factor）必须整合于病毒衣壳内，但是可能并不需要辅助因子出现在所有的外壳蛋白亚基上。因此，如果 1%～10%的外壳蛋白亚基含有传播因子，病毒的表达系统可能会更加有效。同样地，病毒复制酶包括数个功能域（参见第 8 章第Ⅳ节 B 部分）其需求量甚至在不同的时间也有不同。两种均包括这些功能域的蛋白质（其中一种还包含着通读蛋白，还包括其他功能域）的合成可以控制这些病毒基因的高效表达。

10. 策略 10：移码蛋白质（Brierley，1995；Farabaugh，1996a；1996b）

从同一个 5′AUG 开始产生两个蛋白质的另一个机制是通过在 5′端可读框的终止密码子之前发生读框的切换（改变）来产生第二个更长的“移码”（frameshift）蛋白。

翻译移码可以越过一个读框的 3′端的终止密码子而切换到另外一个读框继续翻译直到下一个终止密码子出现（Hizi *et al.*，1987）。移码过程如图 7.21 所示。

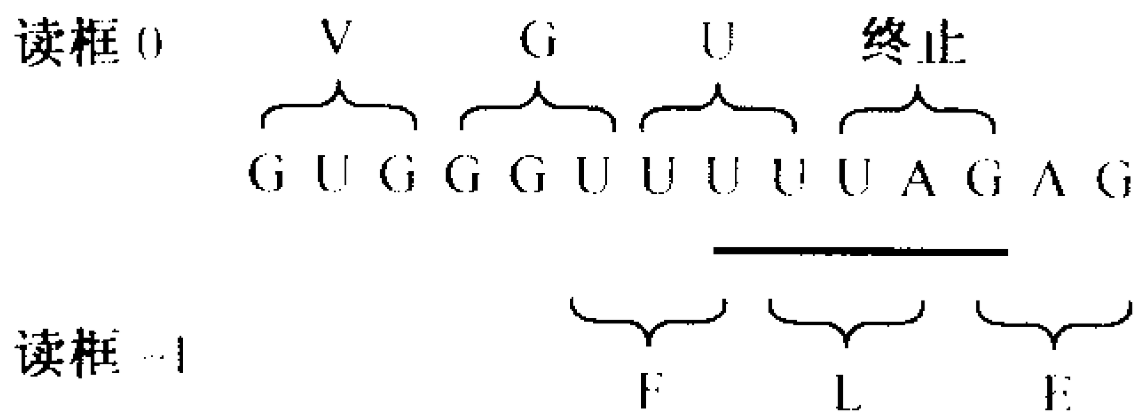


图7.21 翻译移码。在一个 UUUAG 序列处核糖体通过向后滑移一个核苷酸至读框－1从而避开读框 0的终止密码子，然后继续识读读框－1的三联体密码子因而形成融合或移码蛋白。引自 Mathews（1991）。

在移码位点（frameshift site），核糖体通过向 5′方向前移一个核苷酸（－1 移码）或向 3′方向后移一个核苷酸（＋1 移码）即改变其读框。这样就产生了两个蛋白质产物（读框蛋白与移码蛋白），它们在移码位点的 N 端相同，而移码位点的后面不同。并且，正常读框蛋白质的数量总是要大于移码蛋白。移码常常发生在可读框重叠的地方，并且可在重叠区内的任何位置。

至少有 9 个植物病毒属中存在移码策略（表 7.6），并且在已知的所有过程中都有复制酶的参与。大多数移码为－1 方向的，只有长线病毒科（*Closteroviridae*）成员是＋1 方向的移码。

a. －1 相位的移码

对于－1 相位的移码而言，需要 3 个特征：①移码位点的六核苷酸（heptanucleotide）序列也叫“滑动”（slippery）或“移动”（shifty）序列；②移码位点下游位置上的稳定结构的区域；③滑动序列与结构性序列之间的 4～9 个核苷酸段间隔。组成稳定结

表 7.6　可读框之间的移码

病毒科	病毒属	病毒	移码序列	移码类型	信号	蛋白质
番茄丛矮病毒科 (*Tombusviridae*)	香石竹病毒属 (*Dianthovirus*)	RCNMV	D F * G. GAU. UUU. UAG. GC G F L G	−1	茎-环	复制酶
	黍花叶病毒属 (*Panicovirus*)	PMV	N F * C. AAU. UUC. UAG. UG Q F L V	−1	待定	未知
长线病毒科 (*Closteroviridae*)	长线病毒属 (*Closterovirus*)	BYV	R V * CGG. GUU. UAG. CUC G F S S	+1	假结	复制酶
	毛形病毒属 (*Crinivirus*)	LIYV	L K D Y UUG. AAA. GAC. UAUC * K U I	+1		复制酶
黄症病毒科 (*Luteoviridae*)	黄症病毒属 (*Luteovirus*)	BYDV	G F * G. GGU. UUU. UAG. AG G F L E	−1	茎-环或假结	复制酶
	马铃薯卷叶病毒属 (*Polerovirus*)	PLRV	L N G Q U. UUA. AAU. GGG. CA F K W A	−1	假结	复制酶
	耳突花叶病毒属 (*Enamovirus*)	PEMV-1	G N G F G. GGA. AAC. GGA. UU G K R I	−1	假结	复制酶
未归科的悬浮属	南方菜豆花叶病毒属 (*Sobemovirus*)	SBMV	L N C L U. UUA. AAC. UGC. UU F K L L	−1	茎-环	
	幽影病毒属 (*Umbravirus*)	PEMV-2	F W * U. UUU. UGG. UAG. GG F L V G	−1		复制酶

构域的假结下结构及其功能稳定性都参与移码过程（Giedroc *et al.*，2000）。

滑动序列包括两个 XXX YYY Z（X = A/G/U；Y = A/U；Z = A/C/U）类型的同聚核苷酸三联体（homopolymeric triplet）。一旦到达六核苷酸序列时，位于一个读框（X. XXY. YYZ）中的两个与核糖体结合的 tRNA 向 5′方向移动一个核苷酸（XXX. YYY. Z），同时保留了与病毒 RNA 进行碱基配对的 3 个核苷酸中的两个（Jacks *et al.*，1988）。

该机制是为反转录病毒推断出来的，但有证据表明在植物 RNA 病毒中也存在类似的机制。基于实验的结果或根据与其他病毒类似情况推测的一些滑动序列见表 7.6。

Mäkinen 等（1995b）发现在移码位点的前面有一个共同的氨基酸序列模体 WAD/WGD（W = 色氨酸；A = 丙氨酸；G = 甘氨酸；D = 天冬氨酸；E = 谷氨酸），其后紧随着一个富含 D/E 的域。该模体的重要性尚不清楚。

稳定结构区域与移码位点之间有一间隔区（spacer region），可能是发夹状或拟结（拟结结构参见第 4 章第Ⅲ节 A. 3. b）。据认为该结构可导致核糖体的暂停，因此可以起

始移码。最近确定的 BWYV RNA 的拟结的晶体结构（Su *et al.*, 1999）能帮助我们详细了解移码的力学（mechanics）。

有关－1 移码最详细的研究是在黄症病毒属病毒（luteovirus）上做的，并且这些结果适用于其他的病毒。黄症病毒属病毒的两个可读框的重叠区大小不等，在 BYDV-PAV 中是 13 个核苷酸，而在该属的大多数其他病毒中是数百个核苷酸。在 BYDV-PAV 和 BYDV 中，有一个与滑动序列非常相近的终止密码子。在体外翻译系统中，该滑动序列和结构区域的突变分析导致移码的效率在 1%～30%的范围之内。含 A 或 U 残基的滑动序列的移码率要高于含有 G 或 C 残基的滑动序列（Fütterer and Hohn, 1996）。在滑动位点的下游紧跟着终止密码子会提高移码率，可能是因为这种情况促使核糖体暂停。

有人对具有滑动序列和下游拟结的酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的 dsRNA病毒在－1 方向移码期间核糖体暂停的动力学做了研究（Lopinski *et al.*, 2000）。大概有 10%的核糖体在体外系统中于滑动位点暂停并且其中的 60%以－1 方向的移码继续进行表达。这些以－1 方向的移码的核糖体暂停的时间约比体外实验中添加一个氨基酸残基所需的时间长 10 倍左右。因此，核糖体通过移码位点时有三种可能的方式：①不停顿导致不移码；②停顿但不移码；③停顿并且移码。由于酿酒酵母中的移码位点的特征与高等植物病毒中的相应特征相同，因此这些研究结果可能也适用于后者。

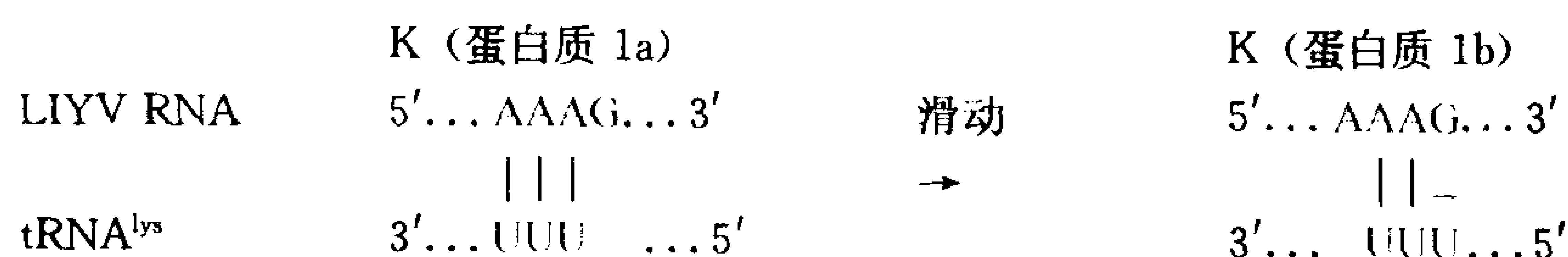
在体外系统中翻译时，全长的 BYDV-PAV 侵染性转录物的移码率高于较短的 RNA（Di *et al.*, 1993），并且临近的终止密码子不是移码所必需的（Miller *et al.*, 1997）。

RCNMV 的全长转录物也具有与上述相似的特性（Kim and Lommel, 1994）。对于 BYDV 而言，位于基因组 3′端的非翻译区以及滑动位点下游的 4 kb 区域的序列都是移码所必需的（Wang and Miller, 1995）。一些证据表明发生了长距离的相互作用，但其性质还需要进一步的研究。

b. ＋1 方向的移码

在＋1 方向的移码需要一系列滑动碱基（a run of slippery bases）以及稀少的密码子或终止密码子。下游结构区域不是必要的，但是在 BYV 中可能存在着这样的区域（Agronovsky *et al.*, 1994）。

下面介绍 LIYV 的 ORF 1a 和 ORF 1b 之间的＋1 方向移码的可能机制（Klaassen *et al.*, 1995）：



c. 移码的比例

像通读策略一样，大多数有关翻译事件发生概率的研究都是在体外系统中进行的。在体外体系中移码发生率可高达 30%，但是在体内移码发生率可能只有 1%～5%

(Brault and Miller, 1992; Prüfer *et al.*, 1992)。

11. 策略 11：剪接

在真核生物由 DNA 产生 mRNA 的过程中涉及剪接（splicing），剪接可去除内部非编码序列并产生各种形式的 mRNA。

具有 DNA 基因组的病毒中，已知两个植物病毒科即花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）和双生病毒科（*Geminiviridae*）利用剪接产生 mRNA。在该过程中，至少就花椰菜花叶病毒属病毒的剪接而言，下游的 ORF 前移至 mRNA 的 5′端。

前面已经讲过，CaMV 主要产生两种主要转录物，分别是大于基因组长度的 35S RNA 和单顺反子的 19S RNA。在 CaMV 侵染的植物中，还发现数种其他类型的 RNA 以及缺失的 DNA 片段（可能是由 RNA 反转录产生的），它们可能是通过剪接产生的 (Vaden and Melcher, 1990; Scholthof *et al.*, 1991; Hirochika *et al.*, 1995)。

在分析 CaMV 基因组的剪接的可能性时，Kiss-László 等（1995）发现在 35S RNA 的前导序列以及 ORF Ⅰ中有数个剪接的供体位点，而在 ORF Ⅱ上存在一个受体位点。在前导序列和 ORF Ⅱ之间的剪接会使 ORF Ⅲ成为 5′端的 ORF，因此使 ORF Ⅲ正常翻译表达。ORF Ⅱ的剪接受体位点的突变体无侵染性，这说明该位点对病毒的侵染循环必需的。因此，这些过程及其他的剪接事件也可能参与控制这些病毒的表达过程。

RTBV 的 ORF Ⅳ是通过从 35S RNA 上经过剪接形成的 mRNA 表达的 (Fütterer *et al.*, 1994)。该剪接过程去除了大约 6.3 kb 的内含子并且将 sORF 1 与 ORF Ⅳ融合在一起形成一个读框。该剪接的供体位点和受体位点序列与剪接的共有序列相一致（图 7.22）。

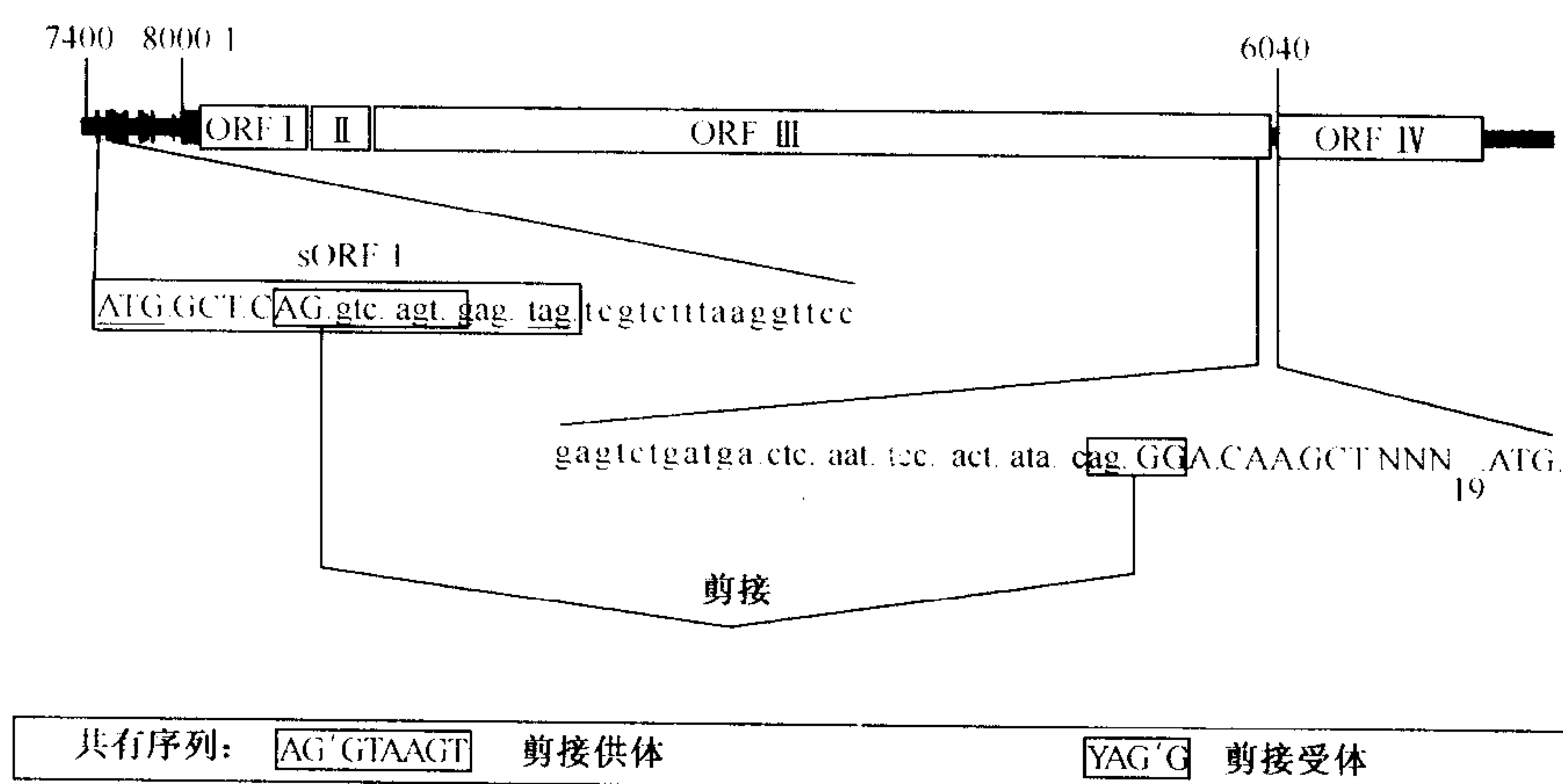


图7.22 剪接接界序列(splice junction sequence)的示意图。显示了假定剪接位点前后的序列并定位于线性化的 RTBV 的示意图中。在5′端，序列以前导序列中的第一个短 ORF(sORF)的 ATG 密码子起始(由框表示，下画线表示起始和终止密码子)。在3′端，序列以 RTBV ORF Ⅳ的 ATG 密码子结束。sORF 和 ORF Ⅳ密码子均被标出。在 cDNA 中存在的序列用大写字母。在经剪接的 RNA 上，在 sORF AUG 处起始的 ORF 与 ORF Ⅳ位于同一个相位。剪接供体和受体位点保守的共有序列也被注明(′为剪接点的标记)。经允许，引自 Fütterer 等(1994)

玉米线条病毒属病毒（mastreviruses）的环状 ssDNA 具有 4 个 ORF，其中两个（V1 和 V2）是由病毒粒体义的转录物表达，另外两个（C1 和 C2）是从互补义链上转录产生的 mRNA 链上（其基因组组构见图 6.5 和图 7.14）。C1 和 C2 转录物的丰度很低，并且在 MSV、DSV 和 TYDV 等病毒中发现 C1 融合于 C2 的剪接事件（Mullineaux *et al.*，1990；Dekker *et al.*，1991；Morris *et al.*，1992）。在其他双生病毒属中还没有发现剪接过程，并且除了 TYDV，其他发生剪接的病毒仅局限于侵染单子叶植物的双生病毒。

12. 策略 12：病毒链及其互补链（双义）的翻译

番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）和纤细病毒属（*Tenuivirus*）病毒的一些基因组片段编码两个蛋白质，其中一个 ORF 为病毒粒体义（virion sense）的，而另一个 ORF 处于互补义（complementary sense）。因此，其中一个蛋白质是由互补义 RNA 表达。这称为双义表达策略（ambisense expression strategy），也是病毒克服真核细胞翻译束缚的一种手段（参见第Ⅳ节 A.2 与 A.3）。

C. 翻译的控制

病毒基因组表达控制的各种机制已经在上一部分做了介绍。上述内容主要是病毒如何克服 mRNA 在真核系统中翻译只限于 5′端这种局限的机制。控制或调节真核生物 mRNA 的翻译的其他主要特征为各种非编码序列［非翻译区（untranslated region）或 UTR］，包括 RNA 的两端，即具有帽子结构的 5′端（参见第Ⅴ节 A）和具有 poly（A）尾的 3′端。参与翻译的控制和效率的还有 5′端的前导序列和 3′的非编码区。在真核生物的 mRNA 中，它们的两端的 UTR 存在着协调的相互作用（图 7.23）（Gallie，1996；1998），甚至还有证据表明有些 mRNA 处于环化的状态（Wells *et al.*，1998）。只有一部分植物病毒 RNA 具有帽子和 poly（A）尾巴结构（表 7.7）。大多数植物病毒只具有两者之一或均不具有，然而这些病毒的翻译也可能是非常高效的。

1. 有帽子结构但无 poly（A）尾

TMV 的基因组具有帽子结构但没有 poly（A）尾。其 3′UTR 的结构非常复杂，包括覆盖 177 个碱基区域的 5 个拟结［图 7.24（B）］。

其中 3′端的两个拟结形成类似于 tRNA 的结构并参与病毒的复制（参见第 8 章第Ⅳ节 H）。另外 3 个拟结组成上游的拟结结构域，并且该结构域在烟草花叶病毒属病毒中是保守的，在大麦病毒属病毒中也存在。该结构域看来在功能上能取代 poly（A）促进 5′端与 3′端的相互作用，并增强帽子依赖型的翻译起始（Leathers *et al.*，1993）。一个 102 kDa 的蛋白质能同时结合到拟结结构域（图 7.24）和 5′ UTR 上（Tanguay and Gallie，1996）。因此有可能上述的 102 kDa 蛋白质参与了使 5′端和 3′端聚在一起的过程，如图 7.23 中的真核细胞 mRNA 一样。

2. 具有 poly（A）尾但无帽子结构

马铃薯 Y 病毒属病毒在 3′端有聚腺苷酸尾，但其 5′端有一个 VPg 相连锁。TEV 的

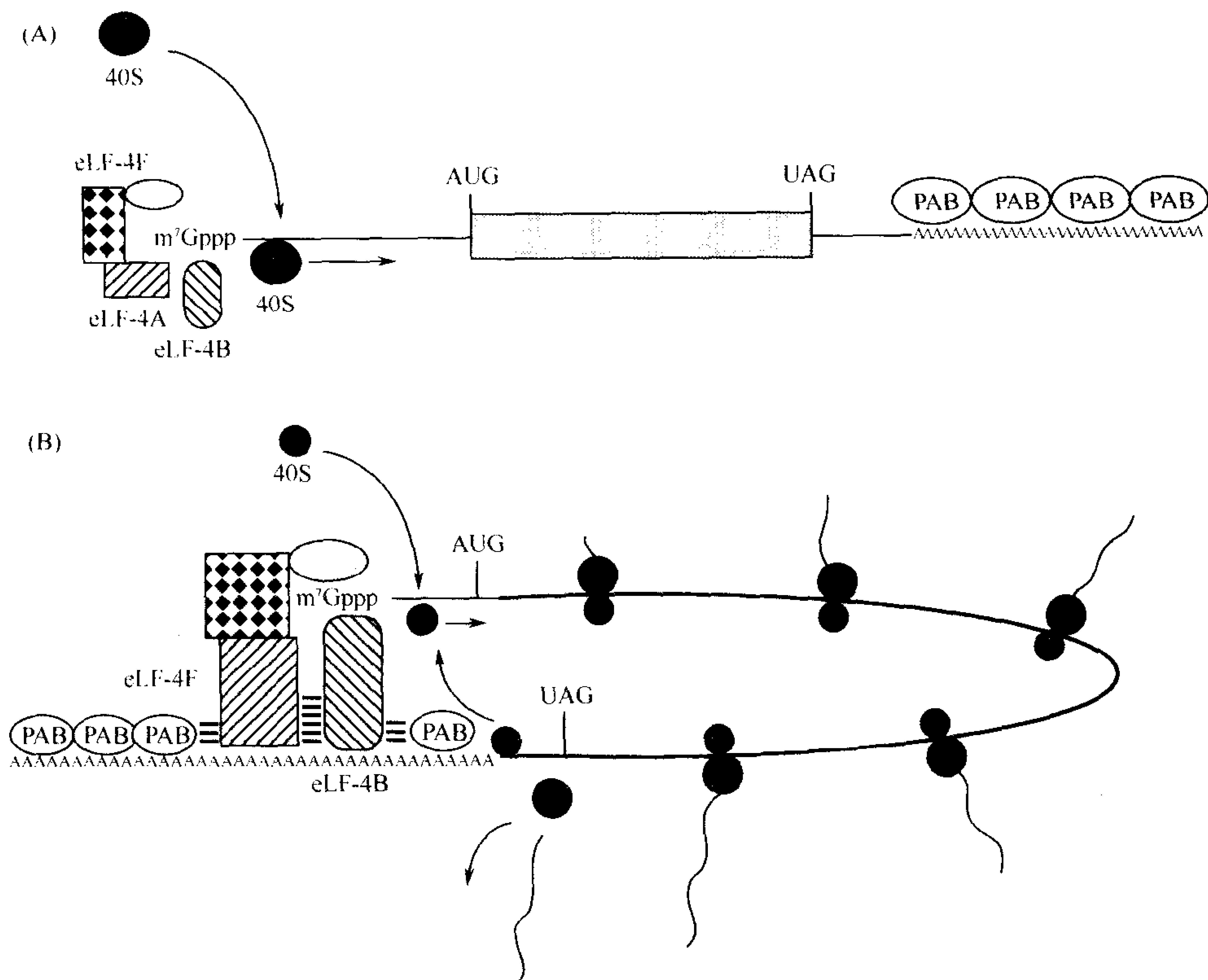


图7.23 mRNA 表达的调控。(A)一个典型的 mRNA 以及结合至末端调节元件的蛋白质的示意图。起始因子 eIF-4F、eIF-4A 和 eIF4B 据认为与5′端帽子结构相关联，同时 poly(A)结合蛋白(PAB)与3′端的 poly(A)尾结合。在起始因子结合后，处于或者接近5′端的40S 核糖体亚基从5′前导序列向下游扫描以寻找 AUG 起始密码子。(B)翻译的共依赖性模型：eIF-4F 和 eIF-4b 共同结合至5′端帽子结构和 poly(A)尾。在 IF-4F/eIF-4B、eIF-4A/PAB 和 eIF-4B/PAB 蛋白质之间的接触可使蛋白质/mRNA 间的结合稳定，此处用蛋白质之间的多重粗线条来表示。这一稳定的复合体与 mRNA 的两个末端保持紧密的接触，从而使核糖体得以有效的循环利用。翻译终止后60S 亚基与 mRNA 分离，而40S 亚基重新循环，返回至5′端参与新一轮的翻译起始。承蒙版权所有者(Kluwer Academic Publishers)惠允，引自 Gallie (1996)。

5′UTR 通过前导序列与 poly (A) 尾之间的相互作用增强了报道基因在不依赖帽子的条件下的翻译（Carrington and Freed，1990；Gallie *et al.*，1995）。通过 TEV 的前导序列的 143 nt 的缺失分析，Niepel 和 Gallie (1999) 鉴定出能够提高不依赖帽子的翻译的两个中心位置的调节元件。将前导序列放在一个双顺反子构建物（bicistronic construct）中顺反子之间的区域，可以增加第二个顺反子的表达量。如果在 TEV 前导序列的上游引入一个稳定的茎-环结构，相应的增强作用更加明显。综合以上所有情况，我们可以得知 TEV 前导序列中的两个元件能一起促进内部起始，而且其中一个元件的功能还受到 5′端附近序列的促进。

马铃薯 Y 病毒属病毒 TuMV 的 VPg 蛋白质可以与拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）和小麦（*Triticum aestivim*）的真核翻译起始因子 eIF（iso）4E 相互作用（Wittmann *et al.*，1997；Léonard *et al.*，2000）。eIF（iso）4E 能结合 mRNA 的帽子结构并在调节

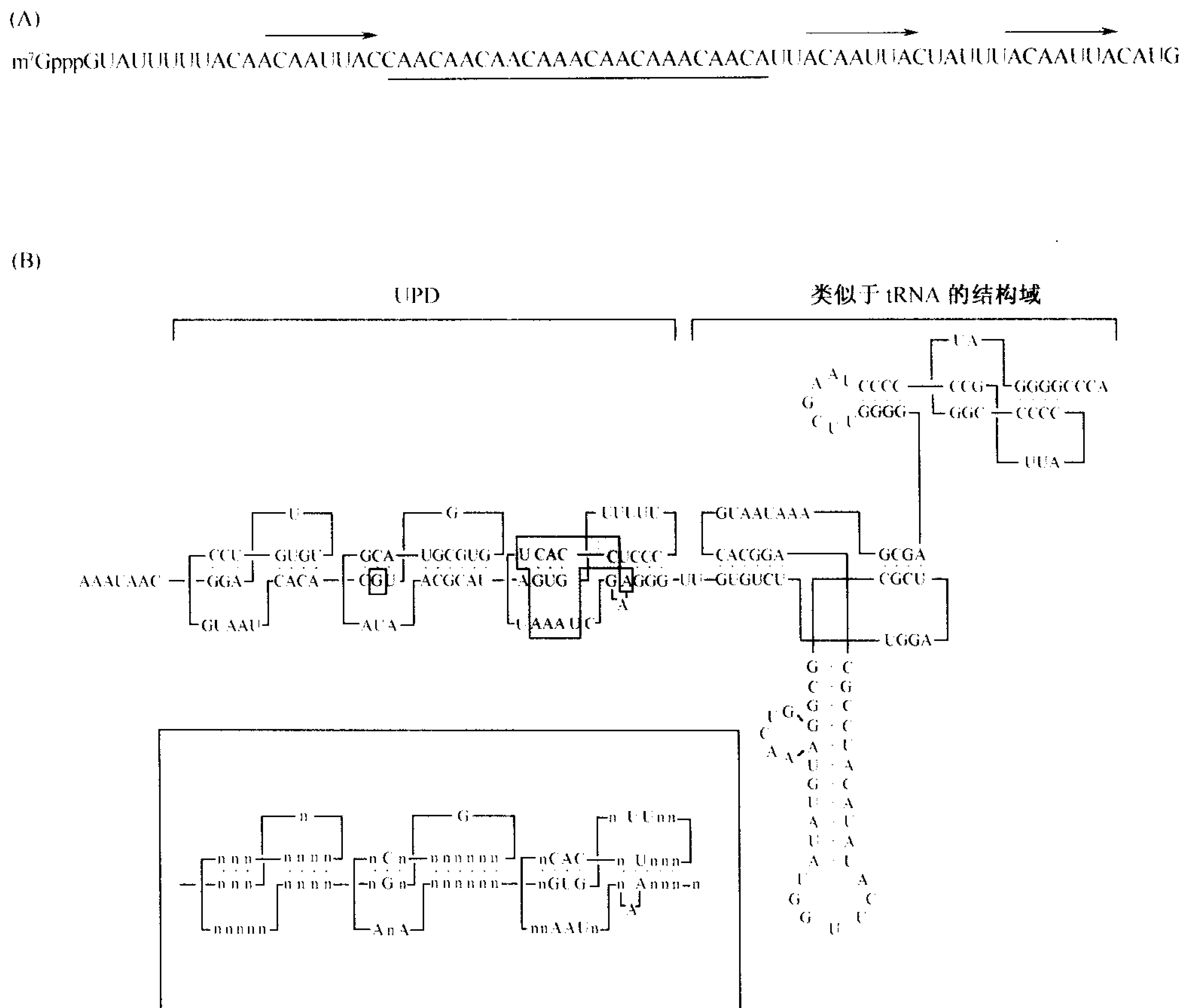


图7.24 TMV 5′前导序列与3′ UTR的序列和结构显示一级序列是调节翻译所必需的。(A)5′前导序列和多聚(CAA)区域与下划线的Ω序列的增强子活性有关。3个直接的重复由箭头表示。(B)3′ UTR的预测结构。上游拟节结构域(upstream pseudoknot domain，UPD)调控所必需的一级序列用阴影表示，并且标出了类似tRNA的结构域。该序列在8种烟草花叶病毒属和大麦病毒属成员(hordeiviruses)中是完全保守的，由框内的UPD表示。经允许，引自 Tanguay 和 Gallie(1996)。

翻译起始过程中发挥重要的功能（McEndrick *et al.*，1999）。

TuMV VPg的互作结构域（interaction domain）已经定位于一个35个氨基酸的序列，并且如果将该区域的一个天冬氨酸残基替换会导致相互作用完全消失（Léonard *et al.*，2000）。

帽子的类似物 m^7GTP，而非GTP，可抑制VPg-eIF（iso）4E复合体的形成，这表明VPg与细胞mRNA为结合eIF（iso）4E而相互竞争。

TEV的含有VPg的NIa也能够以株系专化性的方式结合（strain-specific manner）eIF（iso）4E（Schaad *et al.*，2000），即只有HAT株系（而非Oxnard株系）的NIa能够与番茄和烟草的eIF4E结合。

3. 既无帽子也无 poly（A）尾

许多植物病毒的 mRNA 既没有帽子也没有 poly（A）尾（表 7.7），但其表达仍然十分有效，因此可以认为有其他的增强翻译的因素。目前，有关三种病毒的此方面的知识在细节上还存在差异。

TCV 的 4 kb 基因组表达 5′端的两个基因从基因组 RNA（经通读）表达，而其他 3 个基因是通过亚基因组 RNA（sgRNA）表达。其中两个基因通过渗漏扫描的方式从 sgRNA 1 上翻译，而外壳蛋白则由 1.45 kb 的 sgRNA 翻译表达的。Qu 和 Morris（2000）研究了基因组 RNA 和 1.45 kb 的 sgRNA 的 5′ UTR 及其共有的 3′端在翻译调控中的作用。利用萤火虫的萤光素酶（luciferase）报道基因，他们得到的实验结果是：具有 5′ URT 和 3′ UTR 的 mRNA 的活性最高，该协同作用的效应（synergistic effect）比只含单个 UTR 的 mRNA 的活性总和至少高 4 倍。该翻译增强因素是不依赖于帽子结构的，并且对 sgRNA UTR 的增强效果要高于对基因组 RNA UTR 的增强效果。

TBSV 的 4.8 kb 的基因组含有 5 个已知功能的 ORF 和 3′端的第 6 个未知功能的小 ORF（图 6.23）。3′端附近的 167 nt 区域（片段 3.5）是翻译效率的决定因子（Oster *et al.*，1998），并且已证明参与了不依赖于帽子结构的翻译过程（Wu and White，1999）。片段 3.5 是较大的不依赖于 3′端帽子的翻译增强子（称为 3′CITE），并且没有一个主要的病毒蛋白参与 3′CITE 的活性。与其他小的植物 RNA 病毒（BYDV 和 STNV）的翻译增强子不同，TBSV 在小麦胚提取物的体外系统中没有这种依赖于 3′CITE 的翻译刺激。因此，在这些增强机制中可能存在着一些差异（Wu and White，1999）。

黄症病毒属的 BYDV 的基因组长 5.6 kb，分别从基因组和 3 个亚基因组 RNA 上表达 6 个 ORF（图 6.35）。3′端的翻译增强子序列（3′TE）能高效地促进不依赖性于帽子的翻译起始（Wang and Miller，1995；Wang *et al.*，1997；Allen *et al.*，1999）。在体外实验中，3′端序列的 109 nt 足以使翻译效率增强，但是在体内可能需要更大的 3′端片段使翻译最大程度地增强（Wang *et al.*，1999）。而且，该较大片段的 5′端与 sgRNA 2 的 5′端序列相同。竞争性研究表明 3′TE 增强基因组 RNA 翻译的程度不及对 sgRNA 1 的翻译，原因可能是由于这两个 RNA 的 5′ UTR 不同。因此，3′TE 能够顺式刺激翻译起始，但却选择性地反式抑制翻译。作为基因组 RNA 5′端的基因，其翻译受到顺式刺激和反式抑制，编码一种具有早期功能的产物（病毒的复制酶），这说明 sgRNA 2 是一种新的调节性 RNA，即能使病毒从早期基因表达转变为晚期基因表达（图 7.25）（Wang *et al.*，1999）（图 7.31）。

4. 抢帽子

所有具有分段基因组的负链 RNA 病毒均利用一个称为“抢帽子”（cap snatching）的机制来起始其 mRNA 的转录。在该过程中，含有 12～20 个 5′核苷酸的帽子结构被病毒编码的内切核酸酶从寄主的 mRNA 上切下来，并用来引导转录。在番茄斑萎病毒属的 TSWV 和纤细病毒属的 MSpV 上都存在这种现象（Kormelink *et al.*，1992；Van Poelwijk *et al.*，1996；Estabrook *et al.*，1998）。这两种病毒都能从正义的 RNA 病毒上抢夺到帽子（Estabrook *et al.*，1998；Duijsings *et al.*，1999）。

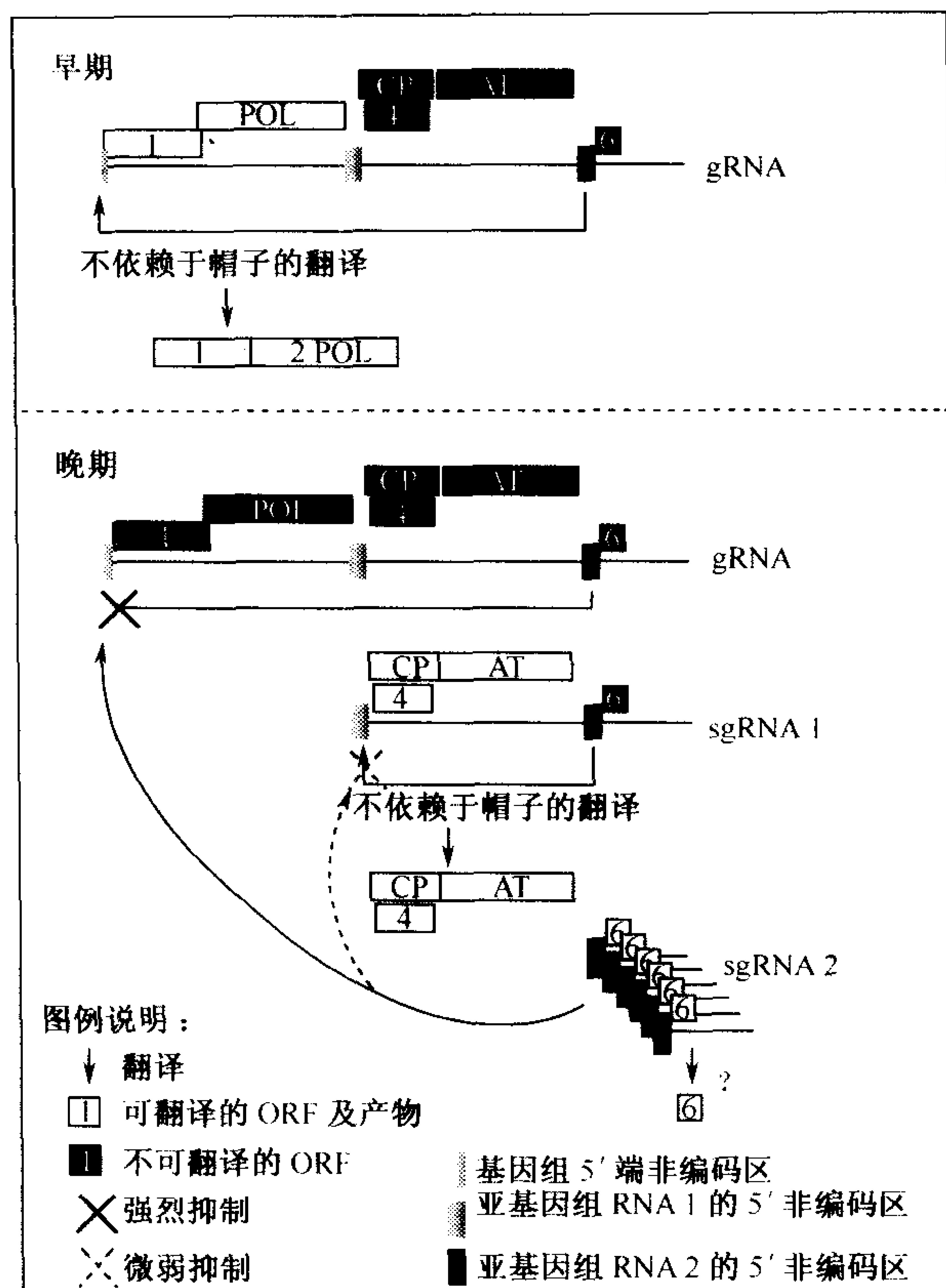


图7.25 （见彩色图版7.2）大麦黄矮病毒（BYDV）通过 sgRNA 2基因表达的反式调控（trans-regulation）的翻译切换（translational switch）模型。空白框代表翻译的 ORF 及其翻译产物（在大箭头下）。黑框代表不翻译的 ORF。早期：通过3′TE（红框）顺式（*in cis*）表达基因组（g）RNA（此阶段唯一的病毒 RNA）翻译出聚合酶。随着 sgRNA 2的大量积累（后期），通过3′TE 反式（*in trans*）特异性地抑制基因组 RNA（粗体红十字）优先于对 sgRNA 1的抑制（虚线红十字）。这就允许 sgRNA 1上的晚期基因可以得到几乎排他性的翻译。gRNA 的 5′ UTR（金色框）和 sgRNA 1的 5′ UTR（绿框）的不同导致了差别抑制。sgRNA 2编码的 ORF 6产物的作用还不清楚（?），但不是反式抑制所必需的。经允许，引自 Wang 等（1999），此论文对该模型进行了详细讨论。

5. 5′非翻译区（UTR）

TMV 的 5′ UTR 不仅能参与增强翻译起始，而且还能增强翻译的效率。5′ UTR 的 67 nt 称为 Ω 序列，它在动植物细胞中可显著地增强下游基因的翻译（Gallie, 1996）；在转基因植物的构建物中它可增强翻译达 4～6 倍（Dowson Day *et al.*, 1993）。Ω 序列有简化的二级结构（Sleat *et al.*, 1988a），其中的一个 25 nt 的 poly（CAA）区域［图 7.24（A）］经诱变表明是体内发挥翻译增强效应的最主要元件（Gallie and Walbot, 1992）。AMV RNA 4 中 36 nt 的 5′前导序列（Joblin and Gehrke, 1987）与 PVX 基因组 RNA 84 nt 的前导序列一样（Pooggin and Skryabin, 1992），也有增强翻译的

功能。

D. 讨论

上面的叙述表明病毒利用各种不同的机制从紧凑的基因组上表达其功能所必需的信息。这种多样性的概括见表 7.7。

表 7.7 正单链 RNA 植物病毒的表达策略

病毒科	病毒属	端		表达策略					
		5′	3′	基因组节段	亚基因组 RNA	通读	译码	蛋白酶解切割	其他
雀麦花叶病毒科 (*Bromoviridae*)	雀麦花叶病毒 (*Bromovirus*)	Cap[a]	t	3	1				
	苜蓿花叶病毒属 (*Alfamovirus*)	Cap	c	3	1				
	黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*)	Cap	t	3	1				
	Ilarvirus	Cap	c	3	1				
	油橄榄病毒属 (*Oleavirus*)	Cap	c	3	1				
豇豆花叶病毒科 (*Comoviridae*)	豇豆花叶病毒属 (*Comovirus*)	VPg	An	2				+	2起始[b]
	蚕豆萎蔫病毒属 (*Fabavirus*)	?VPg	An	2				+	
	线虫传多面体病毒属 (*Nepovirus*)	VPg	An	2				+	
马铃薯Y病毒科 (*Potyviridae*)	马铃薯Y病毒属 (*Potyvirus*)	VPg	An	1				+	
	甘薯病毒属 (*Ipomovirus*)	?VPg	An	1				+	
	桑橙病毒属 (*Macluravirus*)	?VPg	An	1				+	
	黑麦草花叶病毒属 (*Rymovirus*)	?VPg	An	1				?+	
	小麦花叶病毒属 (*Tritimovirus*)	?VPg	An	1				+	
	大麦黄花叶病毒属 (*Bymovirus*)	?VPg	An	2				+	
番茄丛矮病毒科 (*Tombusviridae*)	番茄丛矮病毒属 (*Tombusvirus*)		OH	1	2	+			
	燕麦病毒属 (*Avenavirus*)		OH	1	1	+			
	绿萝病毒属 (*Aureusvirus*)		OH	1	2	+			
	香石竹斑驳病毒属 (*Carmovirus*)		OH	1	2	+			
	香石竹病毒属 (*Dianthovirus*)	Cap	OH	2	1		−1		
	玉米褪绿斑驳病毒属 (*Machlomovirus*)	Cap	OH	1	+	+2			2起始

病毒科	病毒属	端		表达策略					
		5′	3′	基因组节段	亚基因组 RNA	通读	译码	蛋白酶解切割	其他
	坏死病毒属 (*Necrovirus*)		OH	1	2	+			
	黍病毒属 (*Panicovirus*)		OH	1	1	+	−1		
伴生病毒科 (*Sequiviridae*)	伴生病毒属 (*Sequivirus*)	?VPg	An	1				+	
	矮生病毒属 (*Waikavirus*)	?VPg	An	1				+	
长线病毒科 (*Closteroviridae*)	长线病毒属 (*Closterovirus*)	?Cap	OH	1	7~10		+1	+	
	毛形病毒属 (*Crinivirus*)	?Cap	OH	2	+		+1		
黄症病毒科 (*Luteoviridae*)	黄症病毒属 (*Luteovirus*)		OH	1	+	+	+		
	马铃薯卷叶病毒属 (*Polerovirus*)	VPg	OH	1	+	+	+		
	耳实花叶病毒属 (*Enamovirus*)	VPg	OH	1	+	+	+		
未归科的悬浮属	烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*)	Cap	t	1	2	+			
	烟草脆裂病毒属 (*Tobravirus*)	Cap	OH	2	+	+			
	马铃薯 X 病毒属 (*Potexvirus*)	Cap		1	2				
	香石竹潜隐病毒属 (*Carlavirus*)	?Cap	An	1	2				
	葱 X 病毒属 (*Allexivirus*)	?Cap	An	1	+				
	发样病毒属 (*Capillovirus*)	?Cap	An	1	2				
	凹陷病毒属 (*Foveavirus*)	Cap	An	1	+				
	纤毛病毒属 (*Trichovirus*)	Cap	An	1	2				
	Vitivirus	Cap							
	真菌结杆状病毒属 (*Furovirus*)	Capt	t	2	+	+			
	花生丛簇病毒属 (*Pecluvirus*)	?Cap	t	2	+	+			
	马铃薯帚顶病毒属 (*Pomovirus*)	Capt	t	3	+	+			
	甜菜坏死黄脉病毒属 (*Benyvirus*)	Cap	An	4	+	+		+	2起始
	大麦病毒属 (*Hordeivirus*)	Capt	t	3	+				

续表

病毒科	病毒属	端		表达策略					
		5′	3′	基因组节段	亚基因组 RNA	通读	译码	蛋白酶解切割	其他
	南方菜豆花叶病毒属 (*Sobemovirus*)	VPg		1	+		+CfMV	+	
	玉米细条病毒属 (*Marafivirus*)	Cap		1	+			+	
	芜菁黄花叶病毒属 (*Tymovirus*)	Capt	t	1	1			+	2起始
	欧尔密病毒属 (*Ourmiavirus*)			3					
	幽影病毒属 (*Umbravirus*)		OH	1	+		+		

注：a. An = poly (A)；c=基因组节段之间保守的3′端序列；Cap =帽子结构（序列）；OH = 3′羟基末端；t=类似tRNA结构（序列）；VPg =与基因组连锁的病毒蛋白。b. 在同一个可读框（ORF）上经过两次翻译起始。

这些机制的多样性可以使病毒克服寄主的束缚，充分利用寄主的翻译组分。另外两种造成基因产物多样性的机制：在副黏病毒科病毒（paramyxoviruses）中存在的转录编辑（transcriptional editing）（Cattaneo，1991；Niswender，1998），以及蛋白质的反式剪接（trans-splicing）（Perler，1999）等尚未在植物病毒中发现。

这些机制可以分为两大类：一类是特异性地克服真核系统的束缚（如在翻译起始需要帽子结构以及只能翻译5′ORF）；另一类是翻译的控制，即在特定的时空里合成适量的、需要的产物。这两类机制的应用不能被孤立起来，应该协调作用。例如，在许多情况下移码和通读机制为复制复合体提供不同的功能产物，其中上游的较短蛋白质包含解旋酶和加帽活性（capping activity），而下游的一个蛋白质为复制酶。

调节不仅是通过可识别的可读框，还可能包括非编码序列以及可能是通常不被考虑的小可读框。在许多情况下，外壳蛋白基因表达的效率高于复制酶基因；因为外壳蛋白的需求量要比复制酶的需求量大。

许多有关病毒表达系统的研究都是利用体外的技术，尤其是体外翻译系统。从这些系统中得到数据来推断体内情况是有风险的。马铃薯Y病毒属病毒的多聚蛋白的加工过程在兔网织红细胞和小麦胚翻译系统中存在差别（参见第Ⅴ节B.1.b），这表明细胞因子以及可能还有细胞环境很可能参与了其中的过程。此外，至今还没有证据表明一些被认为无帽的病毒RNA在体内的翻译复合体中确实处于这种无帽状态。

上述许多观点会在以下有关利用多分体策略的病毒的讨论中再次提到。

E. 利用多于一种策略的正义ssRNA病毒

大多数病毒同时利用多于一种的上述策略来表达其遗传信息。这一部分将讨论这些利用多策略的例子。

1. 两种策略：亚基因组RNA+通读蛋白

烟草花叶病毒属（Okada，1999）

烟草花叶病毒属（*Tobamovirus*）的多种病毒的基因组已经被测序（Van Regen-

mortel et al., 2000)，并且 TMV 的组构已经在第 6 章第Ⅷ节 H. 1 部分描述过了。有数个紧凑的可读框，其表达如图 7. 26 所示。

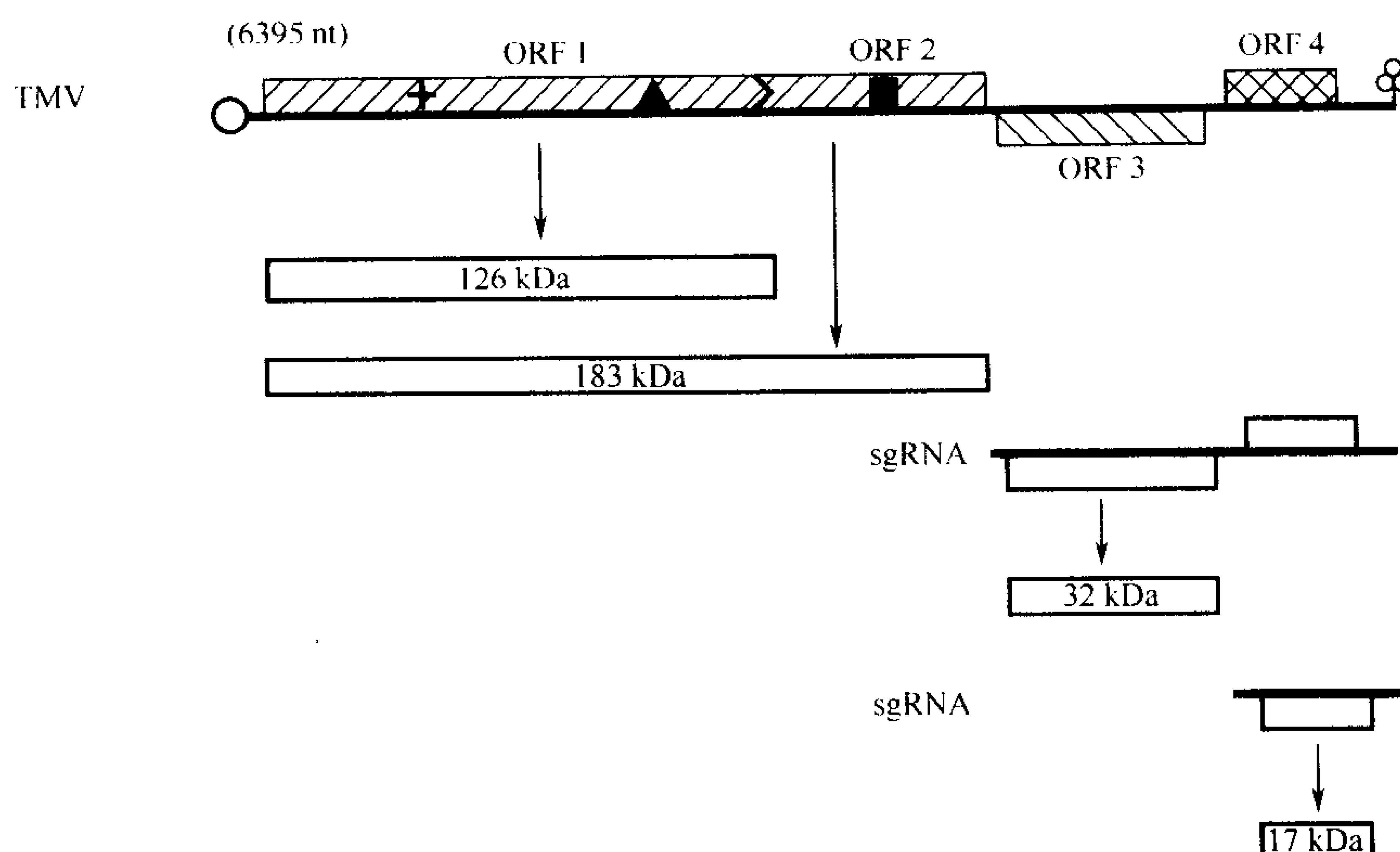


图7. 26　TMV 基因组的表达。其基因组如图6. 36所示，基因组 RNA 是126 kDa 和183 kDa 复制酶蛋白的模板。ORF 3和 ORF 4由两个独立的共3′端亚基因组 RNA 表达，分别形成32 kDa 的移动蛋白和 17 kDa 的外壳蛋白。

一个 M^7Gppp 帽子结构结合于第一个核苷酸［鸟（嘌呤核）苷酸（guanylic acid）］上。长为 69 nt 的非翻译前导序列即 Ω 序列导致高效翻译的情况已经在第Ⅴ节 C. 5 部分讨论过了。编码一个 126 kDa 蛋白质的第一个可读框有一个能产生较大的通读蛋白（183 kDa）的渗漏终止密码子（UAG）。基因组 3′端的两个较小的可读框是从亚基因组 RNA 上翻译的，30 kDa 的蛋白质是从 sgRNA I_2上表达的，而 17. 6 kDa 的外壳蛋白是从最小的 sgRNA 上表达的。3′端非翻译序列可以在末端区域折叠成类似于 tRNA 的结构以接受组氨酸。

第三个亚基因组 RNA（也叫 I_1 RNA）覆盖着 3′端的大约一半基因组，已经在 TMV 侵染的组织中分离出来。SI 作图（SI mapping）表明该 RNA 片段有一个独特的 5′端（位于基因组的 3405 位残基处）（Sulzinski *et al.*, 1985）。该研究小组提出一个 I_1RNA翻译的模型。在 90 bp 的非翻译区的后面有一个 AUG 密码子起始一个 54 kDa 的蛋白质的合成，其翻译终止于 4915 位残基处。因此，该 54 kDa 的蛋白质的氨基酸序列与 183 kDa 的蛋白质的羧基末端的残基相同。然而，目前没有证据表明该 sgRNA 参与了病毒的表达过程。

我们对 TMV 的表达研究的很透彻。下面将介绍对这些过程的了解是如何逐步深入的。

i. 蛋白质的体外合成

TMV 基因组 RNA 已经在数个非细胞体系中翻译表达。在网织红细胞裂解物（Knowland *et al.*, 1975）和小麦胚系统（Bruening *et al.*, 1976）中，有两个大的多肽产生，但是至今还没有发现外壳蛋白的表达。TMV 基因组长度不足于独立地编码所产

生的这两个大蛋白质。Pelham（1978）利用网织红细胞裂解物系统表明这两个蛋白质从一个位点起始表达，而且较大的蛋白质是通过一个终止密码子的部分通读（partial readthrough）产生的。这两个蛋白质的可读框架相同，因此小的蛋白质的序列也包含在大的蛋白质之中。在较低的温度条件下，体外合成的大蛋白质的产量会提高（Kurkinen，1981）。大蛋白质产量提高的程度主要依赖于系统中 $tRNA^{tyr}$ 的含量（Beier *et al.*，1984a，b）（参见第Ⅴ节 B. 9. b）。30 kDa 和 17. 6 kDa 蛋白质不是从基因组 RNA 上翻译的，而是从两个亚基因组 RNA 上翻译的。许多人的研究表明，从侵染组织中分离到的 I_2RNA 也能在体外系统中翻译产生一个 30 kDa 蛋白质。它不具有帽子结构（Joshi *et al.*，1983），并且 5′端以二磷酸或三磷酸为末端（Hunter *et al.*，1983）。

该亚基因组 RNA 的转录起始位点是在基因组中距 3′端 1558 位残基上（Watanabe *et al.*，1984a）。I_2RNA 也包含比较小的 3′端的基因（图 7. 26），但是该基因在体外系统中不被翻译。

TMV 最小的基因（外壳蛋白基因）在体外只能从单顺反子的亚基因组 RNA 上表达（图 7. 26）（Knowland *et al.*，1975；Beachy and Zaitlin，1977）。该基因也能够在体外利用大肠杆菌（*E. coli*）的原核蛋白质合成系统有效地翻译（Glover and Wilson，1982）。

ii. 蛋白质的体内合成

Siegel 等（1978）的实验数据表明病毒蛋白质的合成并不抑制寄主细胞总蛋白质的合成，而是在细胞的正常合成之外的蛋白质合成。侵染两天后，病毒外壳蛋白的合成约占蛋白质合成总量的 7%左右。126 kDa 和 183 kDa 蛋白质的合成分别是外壳蛋白的 1. 4%和 0. 3%左右。

几个研究小组还报道在受侵染的烟草叶片里发现全长的 TMV RNA 和外壳蛋白的 mRNA 都与胞质里的聚核糖体相伴随（Beachy and Zaitlin，1975）。Beachy 和 Zaitlin 还发现 TMV 的 dsRNA 与结合于膜的多聚核糖体相伴随。在原生质体中环己酰亚胺（cycloheximide）能完全抑制 TMV 的复制而氯霉素却不能抑制等结果证明 TMV 蛋白质是由 80S 核糖体合成的（Sakai and Takebe，1970）。

Dorokhov 等（1983，1984a）在经 CsCl 密度梯度离心的受侵染烟草组织的组分中分离到一种核糖核蛋白（ribonucleoprotein），并且这种组分比 TMV 的浮力密度（buoyant density）大。经 EDTA 处理该核糖核蛋白可从聚核糖糖体中释放出来。基因组 RNA、I_1、I_2和外壳蛋白的 RNA 以及各种大小的多肽都被鉴定为该核糖核蛋白质复合体的组分。

通过利用野生型病毒和温度敏感型突变体（*ts* mutant）在不同温度以及蛋白质合成抑制剂的条件下对烟草叶片中的病毒蛋白质表达情况的研究，Dawson（1983）发现 183 kDa、126 kDa 和 17. 5 kDa 蛋白质的合成与 dsRNA 而不是 ssRNA 的合成有相关。有可能从复制复合体新合成的 ssRNA 可以作为 mRNA。Dawson 的结果表明 TMV 的 mRNA 在体内是瞬时存在的。然而，Dawson 和 Boyd（1987b）的研究表明，像大多数的寄主蛋白质一样，烟草叶片中 TMV 蛋白质的合成在热激条件下并不受翻译上的调节。因此，在合适的条件下，所合成的蛋白质大多数都是由病毒编码的。

复制中间体（replicative intermediate，RI）与复制型（replicative form，RF）与

126 kDa 蛋白质一样，都是在侵染的早期出现（有关 RI 与 RF 的内容见第 8 章第 IV 节 A）。外壳蛋白的 mRNA 和基因组 RNA 也是早期产物。在稍后的阶段，外壳蛋白的合成后立即形成子代病毒。因此，看来外壳蛋白的量可能限制子代病毒产生的速率。

Watanabe 等（1984b）在侵染 2～4 h 后首先检测到了 183 kDa、126 kDa、30 kDa 和外壳等蛋白质的存在，随后才发现侵染性的子代病毒。实验结果表明 183 kDa、126 kDa和外壳蛋白持续合成相当长的时间（多个小时），而 30 kDa 的蛋白质及其 mR-NA 在接种后的 2～9 h 内能被检测到。

在受侵染的烟草叶片中（Scalla *et al.*，1976）以及在受侵染的原生质体里（Sakai and Takebe，1974）存在着与 183 kDa 和 126 kDa 等蛋白质大小相近的蛋白质。溴化氰肽（cyanogen bromide peptide）分析发现染病叶片中的 110 kDa 的蛋白质与体外翻译系统类似大小的蛋白质产物相同（Scalla *et al.*，1978）。

在受侵染的烟草原生质体（Beier *et al.*，1980）和叶片（Joshi *et al.*，1983）中都存在着该 30 kDa 蛋白质。Kiberstis 等（1983）与 Ooshika 等（1984）根据推断的该 30 kDa蛋白质序列的 C 端的 11 个或 16 个氨基酸合成多肽并制备抗血清。TMV 侵染的原生质体中产生的 30 kDa 的蛋白质能与这种抗血清发生免疫沉淀反应，并发现这种蛋白质是 I_2 亚基因组 RNA 表达的基因产物。

Kiberstis 等（1983）发现该 30 kDa 蛋白质只能在接种原生质体后 8～16 h 合成。然而，在完整的接种叶片中，这种蛋白质在 24 h 左右合成高峰期后还可以持续合成多天（Lehto *et al.*，1990b）。

很多研究者已证明 TMV 的外壳蛋白在体内的合成过程。因为外壳蛋白的氨基酸全序列早已确定，因此很容易将 TMV 基因组 3′端的核苷酸序列确定为该蛋白质的基因（Tsugita *et al.*，1960；Anderer *et al.*，1960）。

iii. 病毒基因组中的控制元件

在 TMV 的 RNA 中已经有 6 个调节元件被识别或推断出来：

（1）如第 5 章第Ⅳ节 A 部分所述的参与起始病毒的杆状粒体装配的核苷酸序列。该序列可能还有其他的调控作用。通过在体外蛋白质合成系统中研究用 pH8.0 的缓冲液处理过的病毒，结果表明在装配起点的核苷酸序列存在强烈的蛋白质-RNA 的相互作用。该位点可能就是病毒杆状粒体在脱壳期间 80S 核糖体的移动受到抑制的部位。然而，该调控机制的作用在该病毒的不同株系中存在差异（Wilson and Watkins，1985）。此外，病毒的包装可以使病毒基因组从翻译系统中脱离。

（2）3′端的非编码区的复制酶识别位点（参见第 8 章第Ⅳ节 H. 3 部分）。

（3）5′端的帽子和 3′端序列的相互作用（参见第Ⅴ节 C 部分）。

（4）上述能够增强翻译的 Ω 序列。

（5）起始密码子前后序列环境也是翻译调节的一种形式。4 个已知基因产物的每一个起始密码子序列所在的环境都不同。

例如，在 U_1 株系中，其前后序列如下：

126 kDa：ACA <u>AUG</u>G　　54 kDa：GAU <u>AUG</u>C

30 kDa：UAG <u>AUG</u>G　　外壳蛋白：AAU <u>AUG</u>U

根据 Kozak 的模型，30 kDa 蛋白质的此种前后序列是最没有效率的（Kozak，

1981，1986）。这可能就是 30 kDa 蛋白质相对于外壳蛋白而言产量很少的原因。但是即使把这种蛋白质的 AUG 的前后序列改成 Kozak（1986）定义的高效率的前后序列，也不能在烟草植株中提高此种基因的表达量（Lehto and Dawson，1990a）。此外，插入含有外壳蛋白的亚基因组 RNA 启动子的序列和 30 kDa 可读框上游的前导序列也不能提高 30 kDa 蛋白质产物的表达量（Lehto *et al.*，1990a）。事实上，30 kDa 蛋白质表达的延迟因而导致病毒移动受到影响，表明不同的序列影响不同基因表达的时机（timing）。

（6）RNA 启动子大概也能调节亚基因组 RNA 产生的量，但是这些亚基因组启动子的确切序列尚未确定。对于外壳蛋白而言，其亚基因组启动子位于可读框上游的 100 nt序列之内。Dawson 和 Korhonen-Lehto（1990）曾讨论过烟草花叶病毒属病毒基因表达的调节情况。

2. 两种策略：亚基因组 RNA＋多聚蛋白

南方菜豆花叶病毒属（Tamm and Truve，2000）

单体的南方菜豆花叶病毒属（*Sobemovirus*）病毒基因组有 4 个 ORF（其基因组组构见图 6.51）。3′端的 ORF 即外壳蛋白基因，是由一种亚基因组 RNA 表达的（Rutgers *et al.*，1980）。SBMV 的 RNA 在体外可以翻译 4 个主要的多肽：P1（100～105 kDa）、P2（60～75 kDa）、P3（28～29 kDa）和 P4（14～25 kDa）（Salerno-Rife *et al.*，1980；Ghosh *et al.*，1981；Brisco *et al.*，1985）。

似乎 P4 是位于 5′端的 ORF，然而至今还不清楚其他翻译产物编码区的所在位置。SBMV 的豇豆株系（现在称为 SCPMV）的 ORF 2 是核糖体利用在 ORF 1 上渗漏扫描翻译表达的，并且 ORF 2 的 AUG 处于较差的前后序列（poor context）中（Sivakumaran and Hacker，1998）。ORF 2 的产物是一个多聚蛋白并能被病毒编码的蛋白酶切割（Gorbalenya *et al.*，1988）。也有证据表明在 CfMV 的 ORF 2a 和 ORF 2b 之间存在移码情况（Mäkinen *et al.*，1995a；Tamm and Truve，2000），这也表明该病毒可能有三种策略调控表达。

3. 两种策略：亚基因组 RNA＋多分体基因组

a. 雀麦花叶病毒属（*Bromovirus*）

BMV 是一个共有 8234 nt 的三分体基因组，其结构在第 6 章第Ⅷ节 A.1 部分中已经讲过。其中，RNA 1 和 RNA 2 是单顺反子；RNA 3 为双顺反子；3′端的 ORF 是外壳蛋白基因，通过亚基因组 RNA 翻译（图 6.13）。并且该包含有外壳蛋白基因的亚基因组 RNA 也存在于病毒粒体中。

BMV 的 RNA 在体外系统，尤其是在来源于病毒寄主植物的小麦胚系统中，表达效率很高。在该系统中，RNA 1 表达单个 110 kDa 蛋白质，而 RNA 2 表达一个 105 kDa蛋白质（Shih and Kaesberg，1976；Davies，1979）。RNA 3 表达一个 35 kDa 蛋白质（Shih and Kaesberg，1973）。外壳蛋白基因在 RNA 3 中但是不表达。RNA 4 指导 20 kDa 的外壳蛋白的高效合成。但是 RNA 4 的翻译在其他病毒 RNA 片段存在时效率更高，可能是因为与核糖体的结合更加有效（Pyne and Hall，1979）。在体外，外壳蛋白可能是以部分装配的核蛋白的形式特异地抑制 BMV 的复制酶合成 RNA（Horikoshi

et al.，1987）。

BMV 侵染的烟草原生质体中发现了 4 种新的蛋白质。它们分别是 20 kDa（外壳蛋白）、35 kDa、100 kDa 和 107 kDa 的蛋白质（Sakai *et al.*，1979）。同时 Okuno 和 Furusawa（1979）也在分别来自于系统寄主、局部枯斑寄主和非寄主受侵染的原生质体内发现 4 种同样分子质量大小的 BMV 诱导产生的蛋白质。这 4 种蛋白质的基因占病毒基因组的 90%以上。它们的大小与上面所提到的体外翻译产物一致。

b. 大麦病毒属（*Hordeivirus*）

BSMV 的 3 个 RNA 基因组片段，即 α、β 和 γ 的结构在第 6 章第Ⅷ节 H. 14 部分已经讲过。RNAα 是一个表达 130 kDa 的单顺反子。RNAβ 有 5 个 ORF，其 5′端是由基因组表达的 βa 或外壳蛋白。第二个 ORFβb 由亚基因组 β1 表达，其他 3′端的三基因框（参见第 9 章第Ⅱ节 D. 2. f）是由亚基因组 β2 表达的。基因组 RNAγ 片段是双顺反子，其 5′端的 ORF 由该基因组片段表达而 3′ORF 由（亚基因组）sgRNAγ 表达。

4. 两种策略：多分体基因组＋多聚蛋白

大麦黄花叶病毒属（*Bymovirus*）的各个病毒的基因组分为两种 RNA，并且每一种编码一个多聚蛋白（其基因组组构见图 6. 22）。从本质上来看，它们的基因组组构类似于马铃薯 Y 病毒属病毒（potyviruses），并且它们的 RNA 2 的基因产物相当于马铃薯 Y 病毒属病毒的 5′端基因产物。所以，这种多聚蛋白与马铃薯 Y 病毒属病毒的多聚蛋白可能具有相似的切割过程（参见第Ⅴ节 B. 1. b 部分）。

5. 三种策略：亚基因组 RNA＋多分体基因组＋通读蛋白质

烟草脆裂病毒属（*Tobravirus*）

烟草脆裂病毒属成员具有二分体的正义 ssRNA 基因组片段（图 6. 37）。

RNA 1 在兔网织红细胞裂解物系统中产生两种多聚蛋白，其大小分别为 170 kDa 和 120 kDa（Pelham，1979）。这两种多聚蛋白在含有添加亚精胺（spermidine）的小麦胚系统中也能表达，同时有许多较小的蛋白质产物伴随产生（Fritsch *et al.*，1977）。

这两种蛋白质分别对应于如图 6. 37 所示的 ORF 1 和 ORF 2。对 PEBV 加以分析也得到了同样的结果（Hughes *et al.*，1986）。29 kDa ORF 基因产物由亚基因组 RNA（1A）翻译表达（Robinson *et al.*，1983）。29 kDa 蛋白质也由亚基因组 RNA（1B）翻译产生，并且，这种蛋白质并不为病毒在叶片中的复制和细胞间移动所需要（Guilford，1989）。一个包裹在高分子质量细胞组分中的 16 kDa 蛋白质产物也存在于受侵染的原生质体中（Angenent *et al.*，1989a）。

PRN 株系的 RNA 在体外翻译出外壳蛋白，这是经过血清学反应、肽（段）作图（peptide mapping）和真正的外壳蛋白发生特异性聚集形成盘聚集体（disk aggregate）等实验鉴定的（Fritsch *et al.*，1977）。第二个 31 kDa 的非相关蛋白质也能被翻译表达。不同种的病毒和株系的 RNA 2 制备物的体外翻译产物不尽相同，也许部分是因为这些 RNA 2 样品受到一些 sgRNA 的污染。TRV 的 SYM 株系的 RNA 2 在体外实验中未检测出任何信使活性（messenger activity）（Robinson *et al.*，1983）。但是，已证明一个来自于 RNA 2 的亚基因组 mRNA 是外壳蛋白的 mRNA。

总之，RNA 1 有 3 个 ORF，其 5′端类似于 TMV 的 5′端。在 134 kDa 蛋白质基因的末端有一个 UGA 的终止密码子（TMV 的相应密码子是 UAG），利用该终止密码子的通读将产生 194 kDa 的蛋白质。3′端的 ORF 是通过亚基因组 RNA 表达的。就像第 6 章第Ⅷ节 H. 2 部分以及图 6. 38 中所述，RNA 2 在不同的分离物中的长度和 ORF 的数目都可能不同；其 5′端的 ORF 是编码外壳蛋白的，只有该 ORF 是保守的，其他的 ORF 如何表达至今还不清楚。然而，如果外壳蛋白是唯一的蛋白质产物，那么为什么需要一个亚基因组 RNA 呢？即使产生同样的外壳蛋白，也会因为病毒短杆粒体的不同而出现一些特异的病害症状（Robinson，1977）。因此，RNA 2 可能还编码另一种蛋白质。

6. 三种策略：亚基因组 RNA＋多分体基因组＋移码蛋白

香石竹病毒属

香石竹病毒属（*Dianthovirus*）的基因组是二分体的正义 ssRNA（图 6. 30）。RNA 1 有 3 个 ORF，其中 5′端的两个发生重叠。第二个 ORF 在第一个 ORF（27 kDa）的 －1方向的移码而产生 88 kDa 的蛋白质。这两种蛋白质都在体内存在，并且可在体外通过 RNA 1 的翻译产生（Hamilton and Tremaine，1996）。RNA 1 的 3′端 ORF 是通过 1. 5 kb 的 sgRNA 来表达外壳蛋白的。RNA 2 是表达病毒移动蛋白的单顺反子。

7. 三种策略：亚基因组 RNA＋多聚蛋白＋移码蛋白

长线病毒属（*Closterovirus*）

长线病毒属病毒（closteroviruses）具有一个包含多至 12 个 ORF 的大型复杂的基因组（图 6. 33）。前两个 ORF 重叠，并且第二个 ORF 的表达是通过在第一个的＋1 方向发生移码。第一个 ORF 编码一个类似木瓜蛋白酶的蛋白酶（papain-like protease），该酶在两个位点切割。CTV 的前两个 ORF 之间的移码以及蛋白酶解加工（proteolytic processing）能产生 9 个多肽（图 7. 27）（ Karasev and Hilf，1997）。其他 10 个 ORF 均通过亚基因组 RNA 来表达（图 7. 27）。

BYV 基因表达的时间分析（temporal analysis）可以通过用 GUS 基因标记编码 HSP70h、主要的外壳蛋白和 20 kDa 蛋白质（p20，ORF 7）的基因来完成（Hagiwara *et al.*，1999）。该实验结果表明 HSP70h 启动子表达最早，其次是外壳蛋白的启动子，最后是 p20 的启动子。其他亚基因组启动子（sg promoter）的动力学分析是通过 Northern 印迹分析进行的。这两种方法得到的结果表明 BYV 的表达时间的次序是 HSP70h、CPm、CP 和 p21 表达较早，而 p64 和 p20 表达较晚（BYV 基因的名称见表 6. 5）。

8. 三种策略：多组分基因组＋多聚蛋白＋2 个翻译起始位点

豇豆花叶病毒属（*Comovirus*）（Goldbach and Wellink，1996）

豇豆花叶病毒属病毒具有双组分基因组，其中 RNA 1 也称为 B RNA，RNA 2 称为 M RNA，二者分别表达一个多聚蛋白。CPMV 为该属的典型成员，对此病毒研究最多，因此主要讨论该病毒的表达特点。其基因组组构已在第 6 章（第Ⅷ节 B. 1. a 部分）

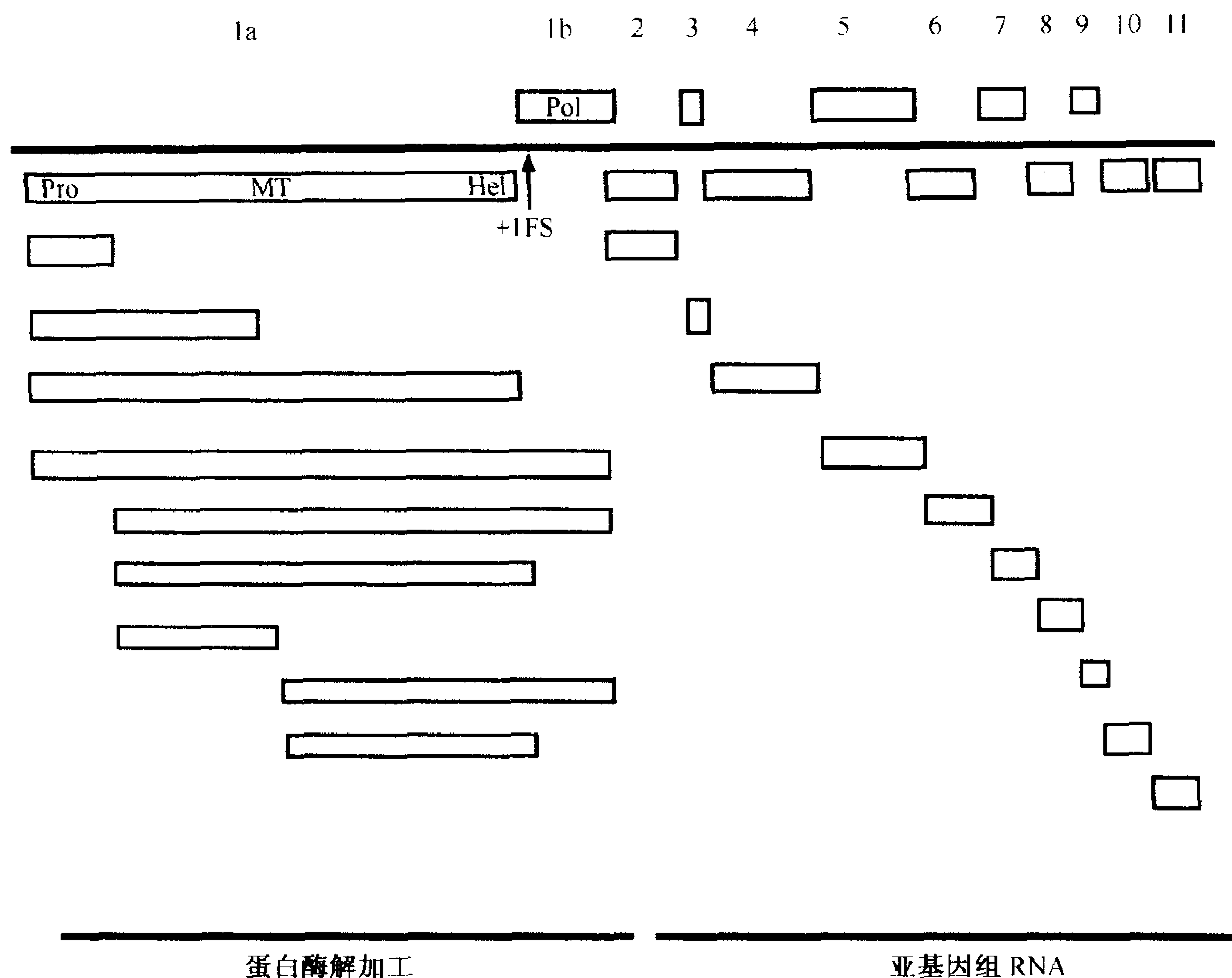


图7.27 柑橘速衰病毒(CTV)基因组的结构图与表达策略。小方框表示对应各自ORF的推定的(putative)蛋白质产物。+1FS表示推定的核糖体移码(ribosomal frameshift)。实线代表通过多聚蛋白前体的蛋白酶解加工以及通过形成嵌套式共3′端亚基因组RNA表达的两个基因组区域。经允许，引自Karasev和Hilf(1997)。

讲到。

i. 加工产物

RNA 1编码的200 kDa多聚蛋白可以在4个位点被切割产生5个产物。RNA 2编码一个105 kDa的多聚蛋白，具有两个翻译起始位点和两个蛋白酶切割位点，最终产生4个蛋白质产物。然而，该加工过程很复杂，并且克隆的表达载体在体内（原生质体）和体外（网织红细胞裂解物翻译系统）实验中均可表达各种中间体产物。研究者用^{35}S-甲硫氨酸标记的CPMV接种原生质体，病毒特异的170 kDa、112 kDa、110 kDa、87 kDa、84 kDa、60 kDa、58 kDa、37 kDa、32 kDa与23 kDa等蛋白质都能很容易地检测到（Rottier *et al.*，1980；Rezelman *et al.*，1980）。显然这些蛋白产物的总分子质量大大超过了这两个RNA的编码能力（coding capacity）。RNA 2编码的37 kDa和23 kDa蛋白质是病毒的两种外壳蛋白。肽作图和免疫分析等实验可以确定RNA 1表达的多聚蛋白的加工过程（图7.28）（Goldbach and Wellink，1996）。

利用多肽的抗体（antipeptide antibody）对体内样品做的实验证实了体外翻译结果，即RNA 2具有两个翻译起始位点。此外，将原生质体在2 mmol/L的$ZnCl_2$溶液中温育抑制了蛋白酶的活性，导致产生了105 kDa和95 kDa的多聚蛋白。这些和其他的数据明确了RNA 2产物的加工过程（图7.28）。

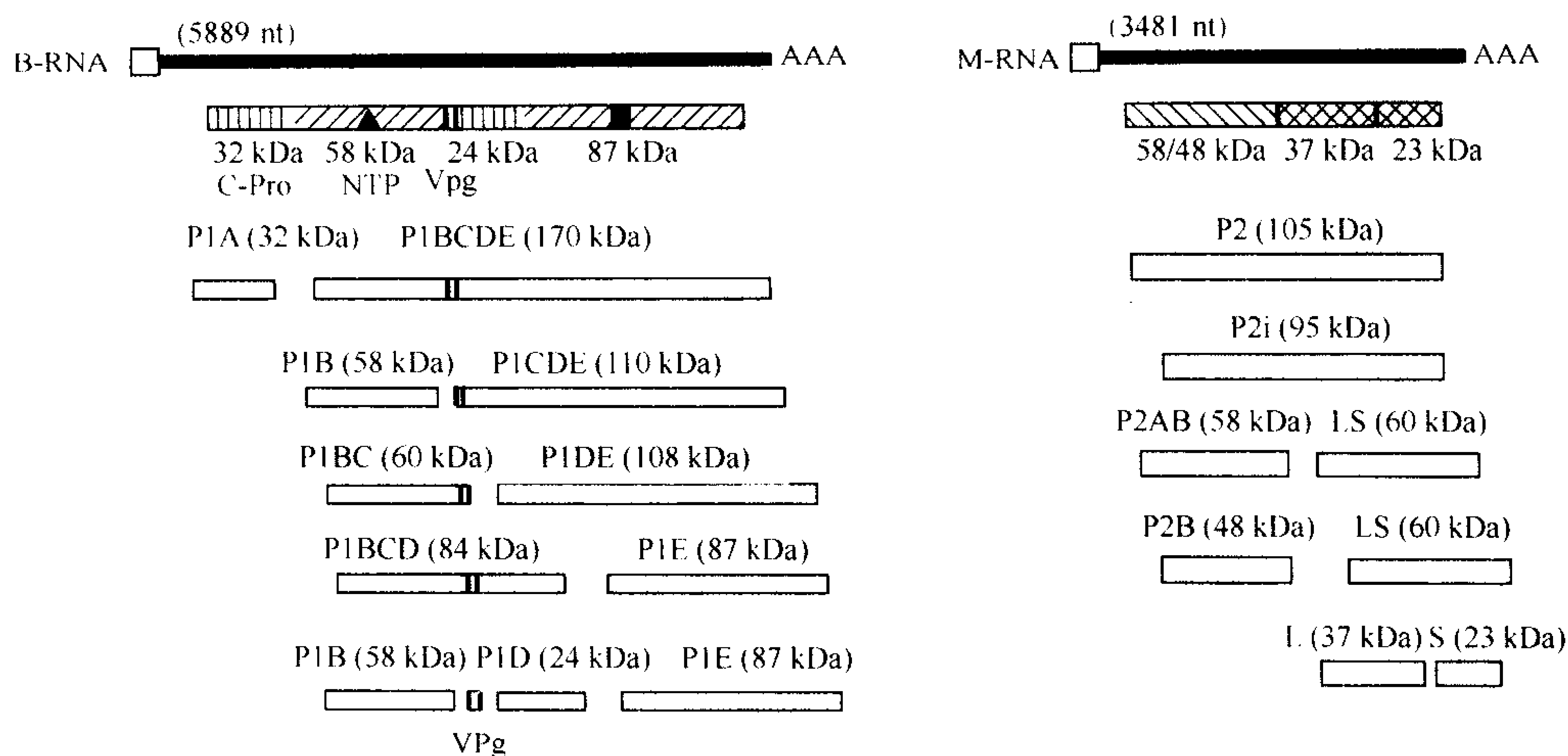


图7.28 豇豆花叶病毒(CPMV)基因组的组构及表达。关于其编码蛋白的描述请参见第6章第Ⅷ节B.1部分。所有的中间及最终切割产物均已在受侵染的细胞中检测到。经允许，引自Wellink等(2000)。

在RNA 2中，在161、512和524三个核苷酸位置开始都有一个AUG密码子。利用定点诱变法，Holness等（1989）证实了161位点上的AUG在体外起始翻译105 kDa蛋白质。161位起始的105 kDa蛋白质和512位起始的95 kDa蛋白质与其切割产物一样都存在于受侵染的原生质体内（Rezelman *et al*. 1989）。

ii. 蛋白酶

CPMV蛋白酶是RNA 1编码的经两种不同的程序产生的24 kDa蛋白质。Wellink等（1987a）合成了一种多肽对应于200 kDa多聚蛋白的氨基酸序列，与小核糖核酸病毒的（picornaviral）3C蛋白酶（3C protease）类似。该多肽的抗体能与CPMV侵染的原生质体和叶片中存在的24 kDa蛋白质发生血清学反应。Verver等（1987）构建了RNA 1的全长cDNA拷贝。在体外转录的RNA能够在体外有效地翻译和蛋白酶解切割。在24 kDa蛋白质的编码区缺失了87 bp造成切割活性的丧失，这表明该蛋白质是病毒的蛋白酶。Vos等（1988a，b）进一步做了这方面的工作，又包括了RNA 2的cDNA拷贝。他们构建了RNA 1上24 kDa蛋白质编码区的一系列缺失突变体（deletion mutant），并表明该24 kDa蛋白质是负责整个B和M多聚蛋白切割的蛋白酶。它顺式切割RNA 1编码的多聚蛋白并且反式切割RNA 2编码的多聚蛋白。该蛋白酶与小核糖核酸病毒的3C蛋白酶有相当高的氨基酸序列同源性（Argos *et al*.，1984；Franssen *et al*.，1984c）。然而，该病毒蛋白酶不同于与之同源的细胞的丝氨酸蛋白酶，因为它的活性位点不是丝氨酸而是半胱氨酸（参见第Ⅴ节B.I.a部分）。CPMV蛋白酶的活性位点由His^{40}、Glu^{75}和Cys^{166}组成（Dessens and Lomonossoff，1991）。

实验表明，在核糖体刚完成24 kDa蛋白质编码区的翻译时，32 kDa蛋白质就很快地从一个200 kDa多聚蛋白上切割下来（Franssen *et al*.，1984a）。剩下的170 kDa多聚蛋白的切割过程在体内和体外都很缓慢。然而，在缺少32 kDa蛋白质的突变体的体外翻译中，该170 kDa的多聚蛋白的切割过程很快就完成（Peters *et al*.，1992a）。

因此，该 32 kDa 蛋白质调控 170 kDa 多聚蛋白的加工效率。RNA 2 编码的多聚蛋白的谷氨酰胺（Gln）-甲硫氨酸（Met）肽键的有效切割需要该 RNA 2 编码的另一个蛋白质（32 kDa），尽管该蛋白质本身并没有蛋白酶活性。

iii. 切割位点

N 端序列分析表明 CPMV 多聚蛋白的切割位点在 Gln/Met（2 个位点）、Gln/Ser（2 个位点）和 Gln/Gly（2 个位点）。所有的切割位置的－2 位上是丙氨酸（Ala）或脯氨酸（Pro），并且这 6 个位点中的 5 个－4 位是丙氨酸（Wellink *et al.*，1986）。

突变分析表明某些位点比其他位点对周围氨基酸残基的约束更大。例如，如果位于两个外壳蛋白之间的切割位点 Gln/Gly 的＋1 位置上 Gly 变成甘氨酸、丝氨酸和甲硫氨酸（存在于其他切割位点的相应的氨基酸），则切割作用几乎完全消失（Vos *et al.*，1988b）。

9. 三种策略：亚基因组 RNA＋多聚蛋白＋2 个翻译起始位点

芜菁黄花叶病毒属（*Tymovirus*）

芜菁黄花叶病毒属的 TYMV 的基因组组构在第 6 章第Ⅷ节 H. 17 已经讲过。这种结构非常紧凑。例如，欧洲的 TYMV 的 6318 nt 的基因组中只有 192 nt（3%）是非编码序列。5′端 ORF 由第一个 AUG 密码子（始于第 88 位核苷酸）开始一直到 1972 位核苷酸处的 UGA 终止密码子（产生 69 kDa 蛋白质）。最大的 ORF 在 95 位核苷酸起始并终止于 5627 位核苷酸的 UAG 密码子（产生 206 kDa 蛋白质）。因此，此 ORF 几乎与 69 kDa 蛋白质基因的全长序列相重叠。3′端的基因编码外壳蛋白。此基因组的 3′端是一个 105 nt 的非编码序列，其中包括一个类似 tRNA 的结构。

i. 亚基因组 RNA

一个小的亚基因 RNA 与病毒的基因组 RNA 包裹在一起并且处于一系列部分充满的不完整的粒体内（Pleij *et al.*，1977）。但是，在体内并不能检测到与这种亚基因组 RNA 长度相应的 dsRNA。Gargouri 等（1989）检测到新生的编码外壳蛋白的正链亚基因组 RNA 以及基因组长度的 dsRNA。因此，外壳蛋白 mRNA 在体内是在基因组长度的负链内部起始合成的。Ding 等（1990b）比对了芜菁黄花叶病毒属各个病毒的亚基因组 mRNA 起始位点前后的核苷酸序列。他们找到了两个保守区域，一个位于起始位点处，另一个位于该 RNA 5′端的 16 nt 序列处（图 7. 29）。该较长的序列也称为“芜菁黄花叶病毒属框”（tymobox），可能是亚基因组 RNA 合成的启动子的一个重要组分。

TYMV 的亚基因组启动子位于一个包含 tymobox 的 494 nt 的片段中（Schirawski *et al.*，2000）。该片段重复序列伸入外壳蛋白 ORF 导致在体内产生第二个亚基因组 RNA，并且该 tymobox 的突变实验表明它是启动子不可缺少的一部分。该 tymobox 区域可以折叠成一个在其他亚基因组启动子常有的发夹结构（参见第Ⅴ节 B. 2）。

ii. 体外翻译研究

小的亚基因组 RNA 在体外系统高效翻译表达外壳蛋白（Pleij *et al.*，1977；Higgins *et al.*，1978）。然而基因组中的外壳蛋白基因在体外不能翻译。

Weiland 和 Dreher（1989）从克隆的全长 cDNA 经体外转录得到有侵染性的 TYMV RNA 转录物。通过对起始密码子的突变，他们证明 69 kDa 蛋白质是由位于 88

APLV-Hu	(?)	GUCUCCCUACUA	GAGUCUGAAUUGCUUC	CCUU-UUU	CAAU	UAAUU----------AUG
BdMV-Eur	(?)	GUUUCUUCACUU	GAGUCUGAAUUGCUUC	AUGGUUUC	CAAU	AGCAACCA--------AUG
CYVV	(?)	GUCUCCCUACGA	GAGUCUGAAUUGCUUC	ACCACUUU	CAAC	UCUCUUGAGAUCAAUCAUG
DMV	(?)	GUUUCGUCACUU	GAGUCUGAAUUGCUUC	AUGGUUUC	CAAU	AGCAAA----------AUG
ELV	(5303-5350)	GAUCCCAUGGUU	GAGUUUGAAUUGCUUC	CCUU-UUC	CAAU	GUACA-----------AUGA
EMV-Trin	(5587-5635)	GUCUCUCAACUG	GAGUCUGAAUUGCUUC	CCUUCUCU	CAAU	AGAUCA----------AUG
KYMV-BP	(?)	GUGUCCCAACUA	GAGUCUGAAUUGCUUC	ACUCCUUU	CAAU	UCUAG-----------AUG
KYMV-JB	(5666-5713)	GUCUCCCAACUA	GAGUUUGAAUUGCUUC	AAUCCUUU	C^AAU	UCUAG-----------AUG
KYMV-PD	(?)	GUUUCCGAACUA	GAGUCUGAAUUGCUUC	ACCAUUUC	CAAG	AUUGAG----------AUG
OYMV-Tin	(5448-5490)	GUCCAGUACCUA	GAGUCUGAAUUGCUUA	CCUC-UUU	C^AAU	C---------------AUG...UAA
TYMV-BL	(5589-5647)	GUUUCCCGCGCU	GAGUCUGAAUUGCUUC	ACUACGUC	CAAU	AGCAAUCAGCCCCGACAUG
TYMV-CL	(5589-5647)	GUUUCCCACGCU	GAGUCUGAAUUGCUUC	ACUAUGUC	CAAU	AGCAAUCAGCCCCGACAUG
TYMV-Roth	(?)	GUCUCCAAGGCA	GAGUCUGAAUUGCUUC	ACUACCUU	CAAU	AGCAACCAACC-----AUG
TYMV-type	(5588-5646)	GUUUCCCACGCU	GAGUCUGAAUUGCUUC	ACUACGUC	C^AAU	AGCAAUCAGCCCCAACAUG
WCuMV	(?)	GUGUCCCAGCUA	GAGUCUUCUUUGCAUC	UCUC-UUU	CAAU	UGAAAU----------AUG
			tymobox			
共有序列			UCUA GUCCUAA		起始框	

图7.29 芜菁黄花叶病毒属成员的(tymoviral)在亚基因组转录起始位点(箭头所示)周围区域的基因组 RNA 的核苷酸序列比对。这些片段在其已得到基因组全序列的基因组 RNA 上的位置由括号中的数字表示。两处同源的序列用框标出。复制酶蛋白基因的终止密码子用下画线标注而外壳蛋白的起始密码子用黑体表示。共有序列为 BMV 亚基因组启动子和(动物)甲病毒属病毒(alphaviruses)可能的亚基因组启动子(Gargouri *et al.*, 1989)。承蒙版权所有者的(Oxford University Press)惠允,引自 Ding 等(1990b)。

位核苷酸处的第一个 AUG 密码子起始表达的,然而更大的基因产物是由位于 95 位核苷酸处的 AUG 起始翻译产生的蛋白质。以较短的 ORF 编码蛋白 C 端人工合成的多肽制备的抗血清能与 69 kDa 蛋白质发生特异性反应,表明在体外此蛋白质得以表达(C. Bozarth, J. Weiland and T. Dreher 与 R. E. F. Matthews 的私人通信)。在 95 位核苷酸处的 AUG 起始翻译的大 ORF 可以在各种体外系统得以表达,然后在体外被切割成较大的 5′蛋白质和较小的 3′蛋白质(Morch *et al.*, 1982, 1988, 1989; Zagorski *et al.*, 1983)。

iii. 体内合成的病毒蛋白

外壳蛋白。生物化学研究表明外壳蛋白在 80S 的细胞质核糖体上合成。Renaudin 等(1975)表明在大白菜原生质体内病毒蛋白质的合成可以被环己酰亚胺(cycloheximide)而不是氯霉素所抑制。细胞学证据证实病毒的蛋白质合成是在细胞质中进行的,但是病毒蛋白也在核中积累。

尿嘧啶类似物,2-硫脲嘧啶(2-thiouracil),能够阻止 TYMV RNA 的合成,但对外壳蛋白合成无影响(Francki and Matthews, 1962)。该结果暗示外壳蛋白的 mRNA 是一种相当稳定的分子。用[^{35}S]甲硫氨酸标记的蛋白质空壳以及病毒核衣壳在侵染的原生质体中的动力学表明这两种蛋白外壳是从不同的蛋白质亚基池(pools of protein subunit)中装配的(Sugimura and Matthews, 1981)。

其他蛋白质。69 kDa 蛋白质在大白菜和拟南芥体内都能检测到。它的表达量仅为外壳蛋白的 1/500,而且看来是一个早期的非结构蛋白。70 kDa 的 C 端片段也能在体内检测到(C. Bozarth, J. Weiland and T. Dreher 与 R. E. F. Matthews 的私人通信)。

Mouches 等(1984)证明 TYMV 的复制酶由病毒编码的 115 kDa 多肽和寄主编码的 45 kDa 蛋白质组成。利用免疫印迹法(immunoblotting),Candresse 等(1987b)表

明该病毒编码的复制酶亚基在接种植物或原生质体之后不久就出现了。

iv. 多胺的合成

在来自于受侵染叶片的原生质体或在体外侵染的健康原生质体中，新形成的病毒粒体主要包含新合成的亚精胺（spermidine）和精胺（spermine）（Balint and Cohen，1985a，b）。当亚精胺的特异抑制剂存在时，会增加精胺的合成而且在病毒粒体中精胺的积累量增加。因此，多胺（polyamine）贡献正电荷的保守方式有一些弹性（flexibility）。Smith（1985）曾讨论过多胺的生物合成以及它们在植物中发挥的可能作用。

10. 4种策略：亚基因组RNA+通读蛋白+移码蛋白+内部起始

黄症病毒科（*Luteoviridae*）所有的3个属的病毒具有类似的表达策略，但是在具体细节上存在着一些差异（Miller *et al.*，1997）。黄症病毒属（*Luteovirus*）和马铃薯卷叶病毒属（*Polerovirus*）的基因组含有6个ORF，而耳突花叶病毒属（*Enamovirus*）的基因组含有5个ORF。它们的表达策略如图7.30所示。

5′端的两个ORF相重叠并且第二个ORF是在第一个ORF的−1方向上移码表达的（参见第Ⅴ节B.10.a）。PLRV的ORF 1的产物可以由该病毒编码的丝氨酸蛋白酶加工（Li *et al.*，2000）。ORF 3、ORF 4和ORF 5由sgRNA 1表达。其中，ORF 3编码外壳蛋白，并且它的终止密码子UAG可以被通读与ORF 5产生通读蛋白。ORF 4通过sgRNA 1由内部起始翻译表达。ORF 6通过sgRNA 2表达。PLRV的第3个sgRNA（sgRNA 3）可能表达推导的（putative）ORF 7（Ashoub *et al.*，1998）。

BYDV的sgRNA 1的5′端已经被定位于基因组RNA的第2670位核苷酸处（Koev *et al.*，1999），并且该位点是重组的热点区域（hotspot region of recombination）。该sgRNA的启动子定位于核苷酸2595～2692之间，计算机分析预测表明该区域的负链形成两个茎-环结构。

体内和体外实验结果表明，PLRV的基因组和亚基因组的前导序列没有翻译增强子的功能（Juszczuk *et al.*，2000）。事实上，缺失分析表明这两种前导序列不仅能降低下游基因的翻译效率而且可改变所表达蛋白质的比率。

黄症病毒属和马铃薯卷叶病毒属病毒基因组的表达机制概括如图7.31。从该图可以看出，这些曾经在第Ⅴ节C.3部分讨论的病毒的表达涉及了复杂的调控机制。

11. 5种策略：多分体基因组+亚基因组RNA+通读蛋白+多聚蛋白+两个翻译起始位点

如第6章第Ⅷ节H.13部分所述，自然条件下受BNYVV侵染的植物中含有4种、有时5种正义ssRNA，但是其中只有两个RNA，即RNA 1和RNA 2才是侵染所必需的。RNA 1只有一个ORF（图6.49），但它的翻译却可以由两个位点起始，即分别在154位和496位核苷酸的AUG起始产生237 kDa和220 kDa蛋白质。该220 kDa蛋白质受到本身包含的（类似木瓜蛋白酶的）蛋白酶的切割产生150 kDa和66 kDa蛋白质（Hehn *et al.*，1997）。BNYVV的RNA 2有6个ORF，其中5′端的两个ORF在同一个读框上并被一个可以抑制的UAG终止密码子隔开。具体上讲，5′端的ORF编码19 kDa外壳蛋白，其终止密子被通读即产生一个75 kDa蛋白质。

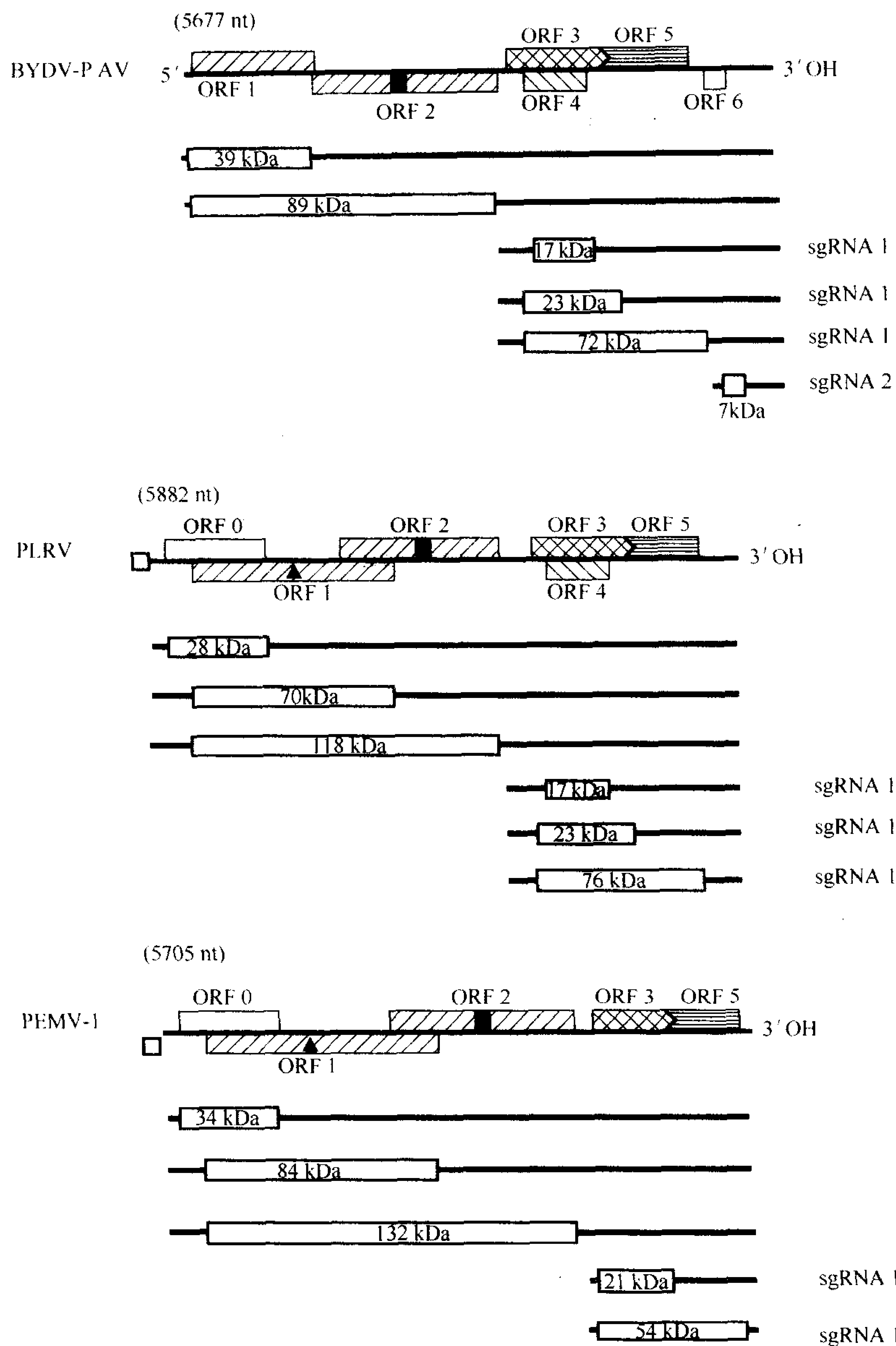


图7.30　黄症病毒科(*Luteoviridae*)各个属的病毒基因组以及翻译产物类型的示意图。实线代表 RNA;框代表 ORF,较细的框代表翻译框,方框表示 VPg。经允许,引自 D'Arcy 等(2000)。

该通读蛋白用免疫金标记（immunogold labeling）可以定位到病毒粒体的端部，并且对于病毒的真菌传播起到至关重要的作用（参见第 11 章第Ⅻ节）（Haberlé *et al.*，1994；Tamada *et al.*，1996）。RNA 2 上的其他 4 个 ORF 由 sgRNA 表达。其中，sgRNA a 和 sgRNA c 是分别编码 42 kDa 和 14 kDa 蛋白质的单顺反子，而 sgRNA b 是编码 13 kDa 和 15 kDa 蛋白质的双顺反子。42 kDa、13 kDa 与 15 kDa 蛋白质的表达类

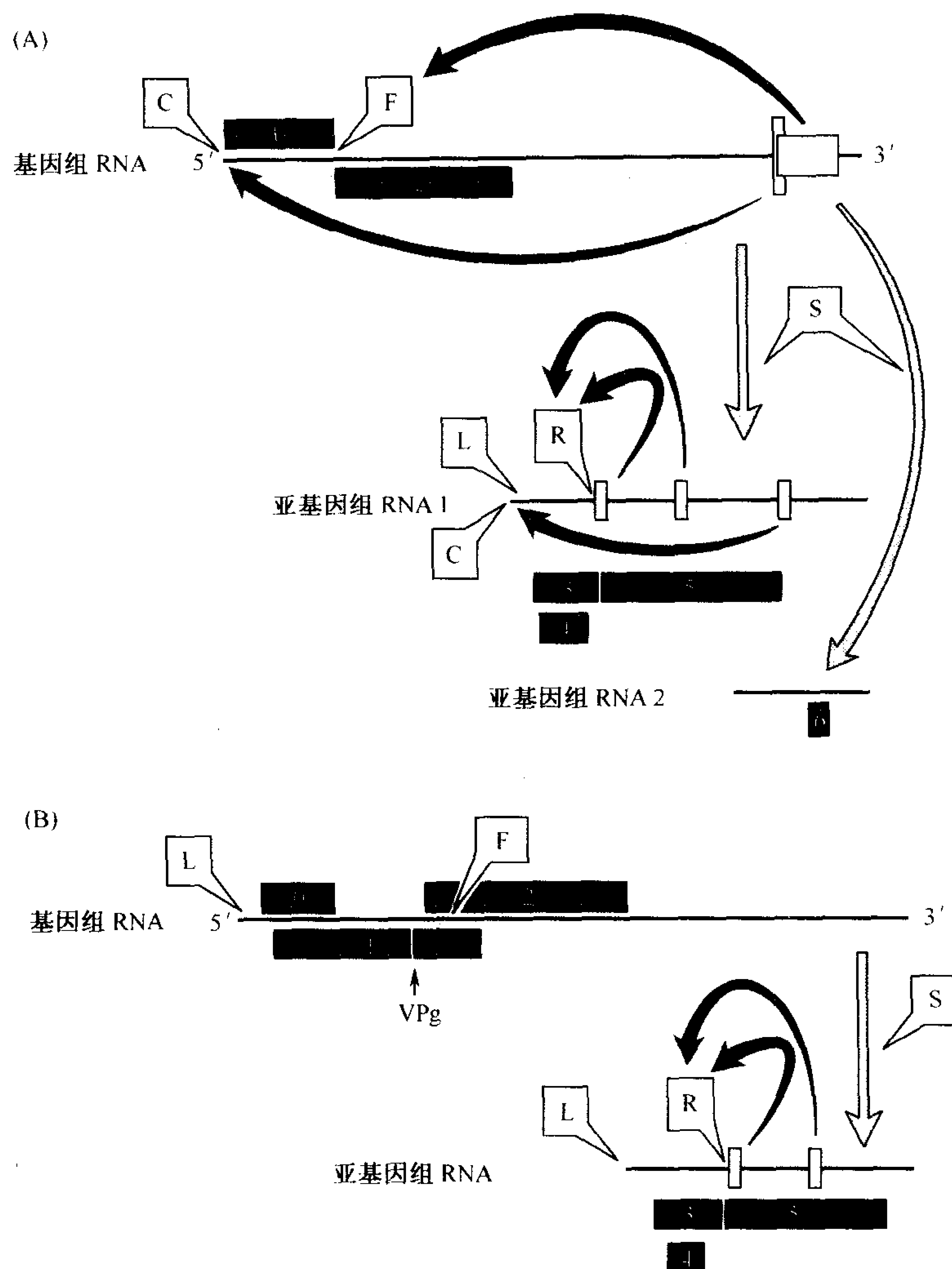


图7.31 (A)黄症病毒属(*Luteovirus*)和(B)马铃薯卷叶病毒属(*Polerovirus*)基因组表达所用的一些机制的示意图。各种机制均由字母表示:C,不依赖于帽子的翻译;L,渗漏扫描;F,－1移码;R,通读;S,亚基因组 RNA 的合成。黑框代表 ORF,白框表示调控序列的位置。暗黑箭头表示远端序列对上游过程的影响,而浅灰色箭头代表一条亚基因组 mRNA 的合成。经允许,引自 Mayo 和 Miller(1999)。

似于 PVX 的三基因块策略。

12. 讨论

以上的例子表明大多数正义的 ssRNA 病毒基因组采用了一种以上的策略以克服其寄主在表达遗传信息时的限制。然而,如上所述,这些逾越限制的手段也被用于控制其基因表达,并且在调控表达时间和表达数量的策略之间经常是相互联系的。

F. 负义单链 RNA 病毒

在第Ⅵ节 A 部分我们已经讨论了负义单链 RNA 病毒的 mRNA 的生成方式。弹状病毒的基因组转录产生一系列单顺反子的亚基因组 RNA。与正义 RNA 病毒不同的是，它们的亚基因组 RNA 是沿着基因组按顺序排列的并且不存在共有的 3′端。这些基因组的表达的主要调控看来是通过在沿着基因组连续转录（sequential transcription）的过程中产生逐步减量的 mRNA。

在本章第Ⅳ节 A.2 与 A.3 讨论过，番茄斑萎病毒属病毒（tospoviruses）和纤细病毒属病毒（tenuiviruses）利用两种表达策略。它们最大的 RNA 片段转录产生单顺反子的 mRNA，而其他基因组 RNA 片段都是双义的排列方式。因此，后者的基因组义（genomic-sense）及互补义（complementary-sense）RNA 都能转录产生 mRNA。至今，还未发现有任何调控机制参与这些过程。

G. 双链 RNA 病毒

植物呼肠病毒的 dsRNA 的转录在大多数情况下都产生单顺反子的 mRNA（参见第Ⅳ节 B)。一些基因组片段可能含有两个 ORF，但是至今还没有证据表明下游的 ORF 能够翻译表达。

H. DNA 病毒

1. 花椰菜花叶病毒科

花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）病毒的 dsDNA 基因组的转录以及所涉及的启动子已经在本章的第Ⅳ节 D 部分讨论过了。对于该科的所有属而言，转录产生一个长于基因组长度的 RNA 即 35S RNA 或 34S RNA。它既可以作为一些基因产物表达的模板，又可以作为复制阶段反转录的模板。一些属的其他 RNA 是由病毒 DNA 转录产生的。有关基因组表达的大多数研究都是以 CaMV 和 RTBV 为材料的，下面将分别详述。

a. 花椰菜花叶病毒

CaMV 基因组由两个启动子转录分别产生 35S RNA 和 19S 的 RNA（图 6.1）。19S RNA 是 ORF Ⅵ编码的一个单顺反子 mRNA，而其他的 5 个 ORF（ORF Ⅰ～ORF Ⅴ）是由 35S RNA 或其产物表达的。有人认为还可能存在着其他转录物，如 ORF Ⅴ（Plant *et al.*，1985；Schulze *et al.*，1990）以及 ORF Ⅰ和 ORF Ⅳ（Kobayashi *et al.*，1998）的单独转录物。但是这些推测尚未被证实。

在从 35S RNA 上翻译 ORF Ⅰ～ORF Ⅴ时面临两个主要的问题。首先，该 RNA 具有至少 600 nt 的长前导序列；其次，这些主要的 ORF 位于推定的 ORF Ⅶ和几个小 ORF 的下游，因此真核翻译系统必须越过这些不必要的 ORF。已提出两种罕见的调控机制来克服以上以及通过剪接打开下游的 ORF 的问题。

第一个非同寻常的调控机制就是避过 ORF Ⅰ前面含有的 ORF Ⅶ和几个小的 ORF。该机制被称为核糖体的转轨作用，即在第Ⅴ节 B.8 部分中讲过的核糖体在高度结构化

的前导序列中直接从供体位点到达受体位点。该核糖体转轨策略可以通过较长的前导序列，使 40S 核糖体亚基到达 ORF Ⅰ的起始密码子的位置开始形成 80S 核糖体并起始翻译。

ORF Ⅰ～ORF Ⅴ是相互紧密相连的，不是有几个核苷酸重叠就是仅被数个核苷酸隔开。在 ORF Ⅰ的终止密码子位点上，可能第二种调控机制开始发挥作用，即该位点被 ORF Ⅵ的产物反式激活机制。在翻译 35S RNA 时，该机制被称为“接力赛跑”（relay race）模型（Dixon and Hohn，1984）。在该模型中一个核糖体首先结合到 RNA 的 5′端开始翻译直至第一个终止密码子。在该位点上，核糖体并不完全脱离 RNA 而是在最近的 AUG（无论是在终止密码子的上游还是下游）处重新起始蛋白质合成。在 ORF Ⅶ及其与 ORF Ⅰ之间的区域（此区域对于实验室条件下的侵染性是非必需的）的定点突变实验支持该模型。在上述的区域插入一个 AUG 会使病毒 DNA 失去侵染性，除非在 AUG 的后面跟随着一个同读框的（in-frame）终止密码子（Dixon and Hohn，1984）。反式激活已经在第Ⅴ节 B.7 部分中讨论过，其作用是阻止核糖体在终止密码子上完全脱离，而使它能在下一个起始密码子上重新起始翻译。Rothnie 等（1994）以及 Hohn 和 Fütterer（1997）对 CaMV 的反式激活过程做过详细描述。

如第Ⅴ节 B.11 所述，越来越多的证据表明在 CaMV 中存在着剪接过程。研究者很难利用 Northern 印迹技术从 CaMV 侵染的组织的提取液中检测到这些剪接过的 RNA，原因是在 35S RNA 杂交带的下面有一个可能来自于 35S RNA 在反转录期间降解形成的弥散带（smear）。

Kobayashi 等（1998）利用在 35S RNA 启动子驱动下的或缺少启动子的葡（萄）糖苷醛酸酶（GUS）分别与 ORF Ⅰ和 ORF Ⅳ的融合构建物转染原生质体。他们对其实验结果的解释是，亚基因组 RNA 参与了 ORF Ⅰ和 ORF Ⅳ的表达。然而，在 CaMV 侵染的植物细胞中尚未发现这样的 sgRNA。

b. 水稻东格鲁杆状病毒

RTBV 的基因组含有 4 个 ORF（图 6.4）。它的 dsDNA 基因组转录产生一个 35S 的 RNA，在经过剪接后形成 ORF Ⅳ的 mRNA（本章第Ⅴ节 B.11 部分）。因此，ORF Ⅰ～ORF Ⅲ的表达与上述的 CaMV 面临着同样的问题。RTBV 含有一个包括 12 个小 ORF（sORF）的长前导序列（大于 600 nt）。ORF Ⅰ有一个 AUU 起始密码子并且在下游的 1000 nt 内在不同的读框上总共只有两个 AUG 密码子，它们分别是 ORF Ⅱ和 ORF Ⅲ的起始密码子。ORF Ⅰ、ORF Ⅱ和 ORF Ⅲ各有一个核苷酸与另一个 ORF 重叠，形成称为 AUGA 的“终止/起始”（stop/start）信号（Hay *et al.*，1991）。这就为下面的 RTBV ORF Ⅰ～ORF Ⅲ的表达模型的建立奠定了基础（图 7.32）。

如本章第Ⅴ节 B.8 部分所述，RTBV 与 CaMV 类似，它的前导序列的大部分也可以被核糖体的转轨机制逾越。转轨使得 40S 核糖体亚基直接移到 ORF Ⅰ的 AUU 起始密码子，该起始密码子的起始效率只有 AUG 的 10%左右。

这表明只有一部分 40S 核糖体亚基在 ORF Ⅰ起始翻译，其他的均转位于下一个 AUG 即 ORF Ⅱ的起始密码子，但其前后序列也不太适于翻译（in a poor context），因此只有部分 40S 亚基在该位置起始翻译，其余的又到达下一个 AUG，即 ORF Ⅲ的起始密码子，且其前后序列适于翻译。

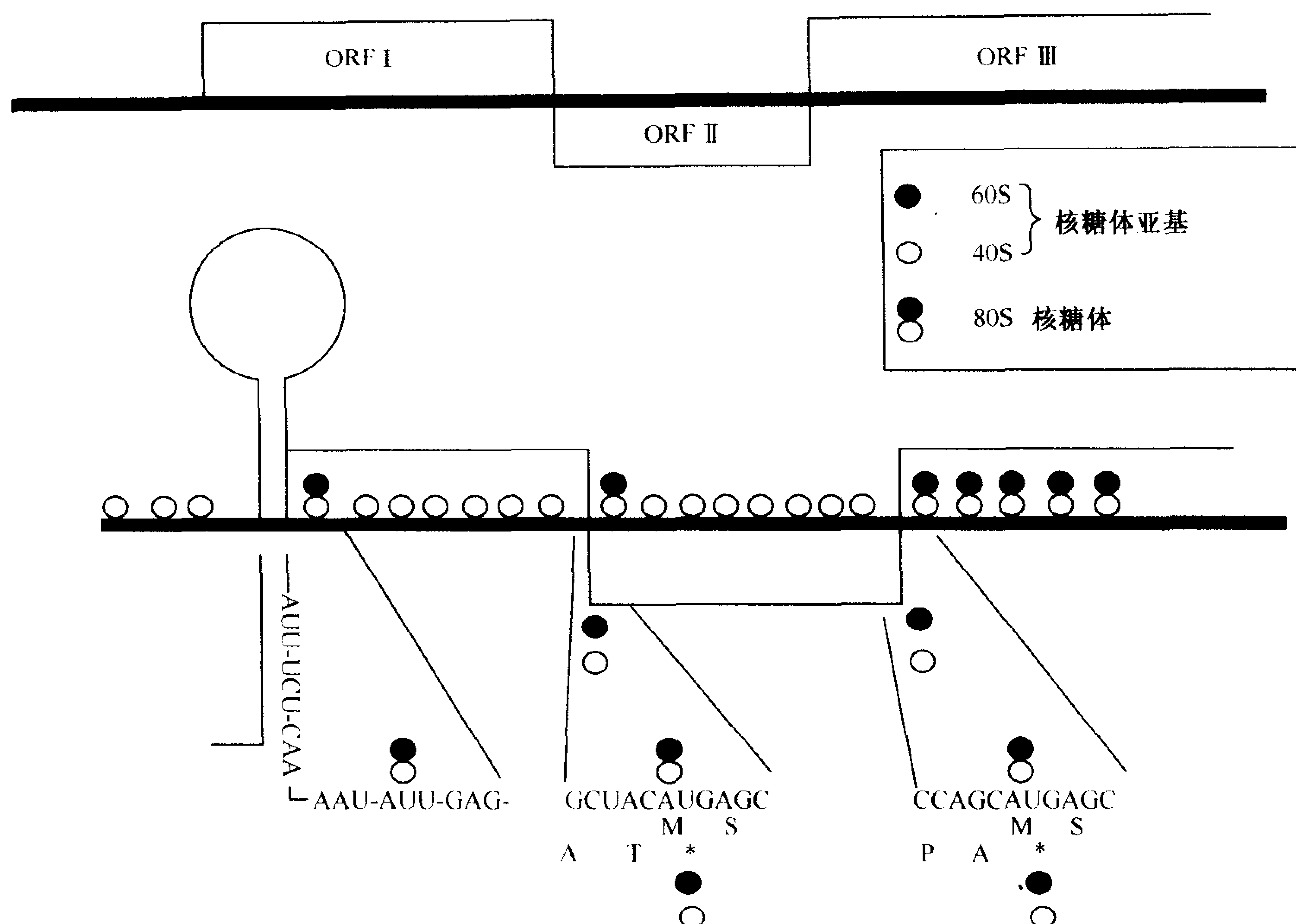


图7.32 水稻东格鲁杆状病毒(RTBV)的前3个ORF表达的模型。顶部粗体线为RTBV的基因组DNA以及ORF Ⅰ~ORF Ⅲ。底部线条显示了带有由35S RNA 5′端形成茎-环结构的基因组及ORF Ⅰ~ORF Ⅲ，以及对核糖体翻译遗传信息的描绘。只有部分核糖体在ORF Ⅰ和ORF Ⅱ的5′端起始，而对ORF Ⅲ的起始则更有效。线条下面的是3个ORF起始位点的序列以及下面对应的蛋白质序列。对80S核糖体的装配以及解装配为核糖体亚单位的过程也做了描绘。数据引自Hull(1996)的综述文章。

2. 双生病毒科（*Geminiviridae*）

从双生病毒的ssDNA基因组上转录mRNA及其调节过程已经在第Ⅳ节E部分讲过，此处不再赘述。

第Ⅵ节 讨论

植物病毒已进化出各种不同的策略以便从最少的遗传物质中有效地表达它们的遗传信息（Drugeon *et al.*，1999）。为了达到这一目的，它们必须克服真核细胞中存在的各种束缚。这些束缚已在本章第Ⅴ节A和B两部分中列出。在克服这些束缚的同时，病毒的mRNA必须和寄主中的mRNA竞争翻译装置（translational machinery），并且在恰当的时间和部位中表达适量的各种产物。因此，这些策略比较复杂，我们现在仅开始了解其中的奥秘。

我们对病毒如何与寄主mRNA相互作用了解很少。在许多情况下，它们表达的mRNA远远高于许多植物基因的mRNA。其中两个病毒属（番茄斑萎病毒属和纤细病毒属）可以通过“抢帽子”机制从寄主的mRNA得到5′端的帽子结构（参见第Ⅳ节

C. 4)，使病毒的信使 RNA 比寄主的信使 RNA 更有利于翻译。但是，那些具有帽子结构的或其他没有帽子结构的病毒如何与寄主竞争呢？一些具有帽子结构的病毒 mRNA 表达的蛋白质量很高。例如，在侵染的细胞中 TMV 外壳蛋白是表达量最高的几种蛋白质之一。在某种程度上，这反映了各种蛋白质的周转率，通过对病毒和寄主在稳态水平（steady-state level）合成的蛋白质量加以比较即可清楚。

然而，尽管有上述这些考虑，可能还存在其他的因子能使病毒的 mRNA 更加有效地占用寄主的翻译装置或者更加有效地翻译。就提高翻译效率而言，可能的重要原因之一就是病毒的 mRNA 的浓度远远高于寄主的 mRNA 的浓度。

病毒 RNA 的有效翻译可能在很大程度上受到远离核糖体结合位点和翻译起始位点区域的影响。我们现在刚开始鉴定这些位点及其相互作用。在第 9 章第Ⅲ节 B. 3 部分所述的研究发现表明，至少某些病毒的侵染对寄主基因的表达有不同的影响，有些关闭表达，有些增强表达，其他的可能无影响。了解其是否为广泛存在的现象并且更深入地理解该机制将是非常有意义的。除了寄主的大分子（如参与病毒表达的核糖体）外，越来越多的寄主蛋白质和因子已被鉴别与利用。可能病毒的 mRNA 对这些蛋白质和因子的亲合力（avidity）也部分说明了病毒表达的相对高效性；另一方面，病毒序列和这些蛋白质及因子之间的相互作用能在一定程度上调控病毒的表达过程。

显然，病毒的各种基因产物在侵染循环期间的不同时间需求的量不同。如上面第Ⅴ节 B. 1. c 部分所述，合成病毒基因组的一个新拷贝仅需要一个或几个复制酶蛋白质分子，然而包装该病毒基因组的外壳蛋白的需求量则高达 60（就 $T=1$ 结构的球状病毒而言）至数千个拷贝（就长的杆状或线状病毒而言）。

此外，病毒侵染循环的早期需要复制酶，晚期才需要外壳蛋白。其他的基因产物，如那些在细胞间移动以及与传播介体相互作用的基因产物在不同时间的需要量也不同。涉及亚基因组 RNA 的病毒表达策略也可以用来同时控制基因产物表达的适当时机与数量。有意思的是，对于许多病毒而言，外壳蛋白基因位于基因组的 3′端，这对于使外壳蛋白在侵染的晚期产生可能相当有效。

然而，如第Ⅴ节（B. 1. c 部分）所述，多聚蛋白策略的利用使病毒蛋白质晚期表达的策略更加难于产生效果。那些通过从多分体基因组表达多聚蛋白的病毒（如豇豆花叶病毒属和大麦黄花叶病毒属病毒），早期需要的蛋白质的基因位于一个基因组组分上，而晚期需要的基因则位于另外一个基因组组分上；这就可能有助于实现表达的时间差别。

（从一个 ORF 到另一个重叠的 ORF 的）移码和（弱中止密码子的）通读的策略能调控下游 ORF 基因产物的相对量。体外研究表明移码或通读发生的概率约为上游 ORF 翻译率的 5%～10%。

这两个策略的大多数产物都是参与病毒复制或与病毒介体相互作用。参与与病毒介体相互作用的、从外壳蛋白基因产生的通读或移码产物均整合进外壳蛋白中，显然病毒对这些基因产物的需求量要小于外壳蛋白本身的需求量。与外壳蛋白相比，我们对复制相关蛋白质的差异表达的要求知之甚少。如果我们对病毒复制的了解更深一步，那么我们可能会改变现在对于病毒侵染早期和晚期的需求情况的认识。如 AMV 的复制需要外壳蛋白的参与（参见第 8 章第Ⅳ节 G 部分），因此不能把外壳蛋白基因看作“晚期”

基因。

综上所述，病毒非常有效地与寄主的 mRNA 竞争以表达其遗传信息。然而，在病毒的增殖过程中，病毒完全依赖于细胞和寄主植物的完整性，因此必须有某种控制措施限制病毒的表达，以免对寄主细胞造成无法修复的损伤。

因此，在避免病毒基因组进入翻译机（translation machinery）方面，包裹发挥着重要的作用。然而，这就提出了更进一步的问题，即如何避免已包裹的病毒再次起始脱壳。如第Ⅱ节所述，病毒粒体的脱壳必须首先要通过改变 pH 或去除二价阳离子等因素使病毒的稳定性下降。有可能新包裹的病毒粒体位于脱壳不能发生的细胞区室内。

第8章　病毒的复制

第Ⅰ节　导言

病毒的主要特征之一就是它们通常具有在寄主细胞内可以高水平地复制自身基因组核酸的能力，而在这些细胞中，对于新的核酸分子的生产通常有严格的限制。一些病毒已适应细胞内存在的复制机制，而其他一些病毒则采用寄主细胞并不广泛应用的复制机制来复制其核酸。

我们对植物病毒复制方式的认识在过去数年里有了显著提高。其中部分原因就是由于许多植物病毒基因组的核苷酸全序列测定已经完成，从而可以确定推定的基因产物的数目、大小和氨基酸序列。我们已经在第6章讨论过大多数植物病毒属代表种的此类资料和其基因组结构。随着基因操作技术的发展，人们已经可以在RNA病毒的侵染循环过程中引入一个人工合成的DNA阶段，从而可以在体外合成具有均一核苷酸序列的侵染性基因组RNA转录物。该技术继而可以在实验中应用定点突变以确定基因组核酸非编码区的功能区域，也可用于确定基因产物与推定基因产物的功能。成熟的体外翻译系统的应用也有助于确定基因产物的功能和特性。

在本章中，将要描述植物病毒是如何复制的。首先，我们一定要牢记：复制不是一个孤立的功能，而是与病毒的许多其他功能密不可分。各种功能的综合协作将在第13章中加以探讨。

第Ⅱ节　植物病毒所利用的寄主功能

和所有其他病毒一样，植物病毒复制在许多方面均紧密地依赖寄主细胞的活性。

A. 病毒合成的原材料

病毒利用寄主细胞新陈代谢所合成的氨基酸和核苷酸构建病毒的蛋白质和核酸。某些病毒中的其他较特殊的成分（如多胺）也是由寄主合成的。

B. 能量

病毒合成蛋白质和RNA所需的能量是由寄主细胞主要以核苷三磷酸（NTP）的形式提供的。

C. 蛋白质合成

病毒利用寄主细胞蛋白质合成系统的核糖体、tRNA及相关的酶和因子，以病毒mRNA为模板合成病毒的蛋白质。看来所有的植物病毒都利用80S细胞质核糖体系统。还没有病毒利用叶绿体核糖体或线粒体核糖体的可靠例证。大多数病毒蛋白质的翻译后

修饰如糖基化（glycosylation）也依赖于寄主的酶。

D. 核酸的合成

几乎所有的病毒都编码一种或多种与其核酸合成相关的酶，但是它们不能提供复制涉及的所有多肽。例如，在花椰菜花叶病毒科病毒复制的第一个阶段，病毒的DNA进入寄主细胞核并由寄主的依赖于DNA的RNA聚合酶Ⅱ转录出RNA。即使不是全部，至少在大部分RNA病毒中，复制复合体包含有病毒编码的依赖RNA的RNA聚合酶(RdRp)、一些病毒编码的其他活性以及多种寄主因子。ssDNA病毒可改变寄主的细胞周期对寄主DNA复制系统的抑制。这些方面的更多细节将在后继章节中展开讨论。

E. 细胞结构组分

寄主细胞的结构组分，特别是生物膜结构，也参与病毒复制。例如，病毒的核酸合成通常涉及一个膜结合复合体。这将在第Ⅳ节C和第13章中更详细地叙述。

第Ⅲ节　研究病毒复制的方法

因为病毒复制牵涉寄主系统，并且和侵染循环的其他阶段紧密整合，所以一般认为要获得病毒复制全过程的完整图景只能依靠体内系统（*in vivo* system）的研究。然而，由于其复杂性，建立体内系统是极其困难的，并且许多关于详细的互作和功能的问题可以用体外系统（*in vitro* system）来寻求解决。在这一节中，将要叙述一些已获得的关于研究病毒复制信息的系统。

A. 体内系统

1. 完整植株

采集完整植物样本所涉及的一些可变因素将在第12章的第Ⅱ节讨论。尽管存在这些困难，但是应该记住，只有通过研究完整的发育中的植物才能解决病毒复制中的某些特定方面的问题，如花叶症状和病毒复制之间的关系。在病毒复制的研究中应用最普遍的组织是绿色叶片。就大多数实验用植物而言，该组织成分占鲜重的50%～70%，而且病毒在叶片中的终浓度通常比植物其他部位高10～20倍。我们把体内植物系统分为4种类型：完整植株、存活的组织样本、组织培养的细胞或器官以及原生质体；病毒复制也在酵母细胞中进行了研究。这些系统的优点和难点将在下文进行讨论。一些植物病毒也在它们的昆虫介体内复制。这部分内容将在第11章中讨论。

a. 接种的叶片

叶片接种有几个优点。与系统性侵染相比，接种叶片中所发生的事件可以从接种时起更精确地计时。可以从不同的植物选择一组相当一致的叶片用于接种，而且可留半叶作为对照材料。但此方法有两个主要的缺点。

(1) 一个典型的叶片，以烟草叶片为例，表面积为200 cm^2，大约包含3×10^7个细胞。在最适条件下，经机械接种可以被侵染的表皮细胞的最大比例还不十分清楚，估计

每片叶不会超过10^4个细胞。因此在接种实验的开始，叶片系统中只有约1/1000的细胞被侵染。即使那些被直接侵染的细胞，侵染的同步性也不可能很明显，尤其是以完整的病毒作为接种物时。因此，少数受侵染细胞的早期变化可能会被数目相对庞大的未侵染细胞稀释而无法被检测到。然后，随着侵染的发展，将会产生一个处于侵染的不同阶段的混合细胞群体。

（2）接种叶片组织的第二个主要缺点，至少对于研究开始的几小时内的事件而言，机械接种本身是对叶片的剧烈刺激，引起呼吸作用、水含量以及包括核酸合成等其他许多方面的改变。因此，使用适当处理过的对照叶片是必需的。

面临的第三个难点是无法应用于用放射性标记的病毒作为接种物的实验。涂抹到叶片上的大多数病毒没有侵染细胞，因而在接种之后确实有比例不定的病毒不能被冲洗掉。侵染粒子的去向很可能会被大量残留在叶片表面或者内部的潜在的侵染性接种物所掩盖。

对于某些特定的实验，针对使用接种叶片的两点改进已经被证明相当有用。在适当的条件下生长的一些叶片，从叶片表面剥去表皮相当容易。虽然这个方法获得的组织数量非常有限，但是有时接种后不久由于某种因素的作用，可以很快将感染的细胞比例提高约8倍（Fry and Matthews，1963）。

一些工作人员已经使用显微操作的方法侵染叶片上的单个细胞——通常是叶毛细胞，然后，可用相差或紫外线（荧光）显微镜观察或用荧光抗体标记来跟踪发生在活细胞中的侵染事件（参见第9章第Ⅱ节B）。尽管该方法已经给出一些有用的信息，但它局限于显微镜检查，目前尚不能用于生物化学的分析。它主要用于研究病毒在细胞间的运动，同时也可获得关于病毒及其基因产物在细胞内分布的有关信息。

b. 系统性侵染的叶片

从被接种的叶片开始移动，病毒可能首先侵入新生的叶片，然后依次侵染更老的叶片（图9.2）。因此，对于病毒侵染，系统侵染的叶片可能处于非常不同的状态。此外，在同一批植物个体之间，侵染性物质从接种的叶片移动到新生叶片所需时间可能存在非常明显的变化。不过，在接种1～2天后，系统侵染的幼嫩叶片的大部分细胞均有可能被侵染（当病毒进入植物时叶片大约4 cm长，如烟草和大白菜）。这样的叶片已经用来研究TMV（Nilsson-Tillgren *et al.*，1969）和TYMV的复制（Hatta and Matthews，1974；Bedbrook *et al.*，1974）。

调控温度可以明显地提高系统侵染的新生叶片内侵染的同步性（synchrony）。植株的下部接种叶片保持在常温（25～30℃），而上部叶片保持在5～12℃。在此条件下，新生叶片发生系统性侵染，但并没有进行病毒复制。当上部叶片改变到较高的温度时，使以一种相当同步的方式开始进行复制（W. O. Dawson *et al.*，1975）。此方法提供了一个非常有用的系统！据报道可作为研究病毒在原生质体中复制的补充。该技术使用整株植物、简单易行，并且能够提供数量充足的材料。主要条件是需要拥有上部叶片和下部叶片保持在不同的温度下仍然能成为系统侵染的寄主植物。这种方法已经应用于一些其他的病毒，如烟草上的CMV（Roberts and Wood，1981）。

c. 转基因植物

在植物中表达病毒基因，通常与病毒基因组的诱变相结合，现在已经被证明是一种

十分有效的研究手段。植物转化已在第 7 章（第Ⅲ节 D. 2. d）中讨论过。

d. 病毒的诱突

许多病毒已经获得侵染性 cDNA 或 DNA 克隆，从而使构建特定的突变体用以研究这些突变在整株中对病毒复制的影响成为可能。

e. 病毒报道系统

对克隆的病毒基因组进行操作，可以使其表达报道分子。报道分子通常为表达后与病毒特定基因产物融合或者单独从病毒基因组中表达出来的荧光蛋白（见第 9 章第Ⅱ节 B）。这使我们可以在完整植物中实时地进行研究病毒，而且能获得目的基因功能的精确定位的细节。

2. 存活的组织样本

a. 离体叶片

当需要相当大量的叶组织时，采用这些离体叶片是有用的。可以将叶柄（petiole）置于水或一种营养液内。在这些条件下，叶片在吸取液体数量上差异较大，而可能无法预知地枯萎。叶柄切口附近的组织可以担当吸取放射性标记代谢物的一个“库”（sink）（Pratt and Matthews，1971）。另一方面，该方法将在培养期间组织内微生物（microorganism）的生长问题减到最少。更普遍的做法是将离体叶片放在保湿的玻璃培养皿内，但很可能会存在细菌、真菌和原生动物（protozoa）的生长污染这一问题。

b. 叶盘

利用打孔器从叶片上切取直径 5～20 mm 的组织圆盘并且放在蒸馏水或一些营养液上飘浮。其优点是，来自许多叶片的叶盘可以组合在一个样本中以消除叶片与叶片之间的差异。用来取叶盘的叶片的生理状态影响放射性标记物质的吸收和代谢（Kummert and Semal，1969）。此方法可能存在两个严重的缺点：①微生物可长在叶盘的表面和细胞间隙中，因此附加抗生素不可能阻止所有的微生物而且可能改变目标细胞的生化状态。②离体叶盘在如下几个方面是不均一的（Pratt and Matthews，1971）。首先，组织叶盘从切口边缘到中心存在一“位置”梯度（“geographical” gradient），差异表现在对标记物前体吸取以及其在核酸合成中的利用方面；其次，离体组织在它们从培养基累积物质的能力上以一种复杂的方式随时间而变化，在维管束切口可能存在标记物前体有差别的积累。第三，离体组织用诸如放线菌素 D 一类药物处理时，这类药物在组织内的分布可能非常不均衡，因而引起更多的差异。

c. 表皮条

Dijkstra（1966）探索了利用 TMV 接种后立刻从叶片上撕取并漂浮在营养液或蒸馏水上的表皮条（strips of epidermis）来研究 TMV 复制的可行性，但是该系统目前还没有取得重大的进展。

3. 组织培养

植物细胞可以在下列几种组织培养方式中生长：①整个组织器官（如根或茎尖）；②生长在固体或液体培养的愈伤组织块；③悬浮细胞。尽管接种 TMV 的烟草愈伤细胞产生了较高产量的病毒，但病毒在培养的组织或细胞内产生的数量通常还是要比在整片

绿叶内形成的少很多（Murakishi *et al.*，1971；Pelcher *et al.*，1972）。在病毒复制的研究中已经测试了各种不同的方法，但除了一些微观的研究以外，结果令人失望。White等（1977）和Wu等（1979）已经将W.O. Dawson等（1975）的低温预培养程序应用于植物病毒侵染愈伤培养物，获得的TMV侵染烟草愈伤细胞生长曲线与用原生质体获得的曲线具有可比性。

4. 细胞悬浮液和组织碎块

原则上讲，存活着但不分裂（non-dividing）的悬浮细胞在研究病毒复制上提供了相当多的优点。来自组培愈伤的解离细胞（dissociated cell）和通过酶解分离的叶片细胞已经得到应用。例如，Jackson等（1972）成功地利用了分离的叶片细胞研究TMV RNA的复制。

5. 原生质体

原生质体是分离的缺乏存在于完整组织内的僵硬纤维素胞壁的植物细胞。Cocking（1966）通过使用酶降解细胞壁首次从番茄果实分离出原生质体。Takebe等（1968，1969）和Aoki等（1969）研究表明，可以从烟草叶片细胞分离出新陈代谢活跃的原生质体，而且这类原生质体可以同步地被TMV或TMV RNA侵染，因而可以在原生质体内研究病毒复制。此后，已经从许多种寄主制备出原生质体，而且可以被多种病毒所侵染。Murakishi等（1984）和Sander等（1984）对这方面的进展进行了综述。有关分离和接种原生质体的方法由Dijkstra和de Jager（1998）进行了总结。

由烟草叶片制备原生质体方法的要点如下：从叶片组织撕去下表皮层，然后用一种来自根霉菌（*Rhizopus* spp.）被称为离析酶（macerozyme）的市售果胶酶（pectinase，polygalacturonidase）制剂溶液进行真空浸润。培养基含有0.4～0.7 mol/L甘露醇（mannitol）和0.5%硫酸葡聚糖钾盐（potassium dextran sulfate）。然后叶片碎块放在水浴中摇动。先从组织释放出来的部分细胞可以丢弃。过滤去除叶脉和类似碎片，细胞通过离心收集，然后用一种纤维素酶制剂（cellulase preparation）[来自木霉菌（*Trichoderma viride*）] 处理。在完全去除纤维素细胞壁后，细胞仅被质膜包裹，呈球状（图8.1）。

从1 g烟草叶片经2 h处理可以获得大约10^7个栅栏细胞（palisade cell）。现已建立了许多存在微小差异的制备程序（Kassanis and White，1974；Beie and Bruening，1975，1976；Motoyoshi and Oshima，1976；Shepherd and Uyemoto，1976；Kikkawa *et al.*，1982）。改良的同步侵染原生质体的能力使植物病毒学家能够完成病毒一步生长（one-step virus growth）实验（图8.2）；这是一种重要的实验，早已用于细菌病毒和哺乳动物病毒的研究。

除了优化侵染的同步性，原生质体还有一些其他的优点：①可以精确控制实验条件，可通过移液管进行均一取样；②具有高比例的被侵染细胞（时常达到60%～90%）和相对高的侵染效率；③像叶绿体和细胞核等细胞器，从原生质体分离比从完整叶片分离的条件要好很多。但必须牢记一些实际的或潜在的局限性和困难。

（1）原生质体在机械和生化两方面都非常脆弱，而且它们的脆弱性都可能因植物的

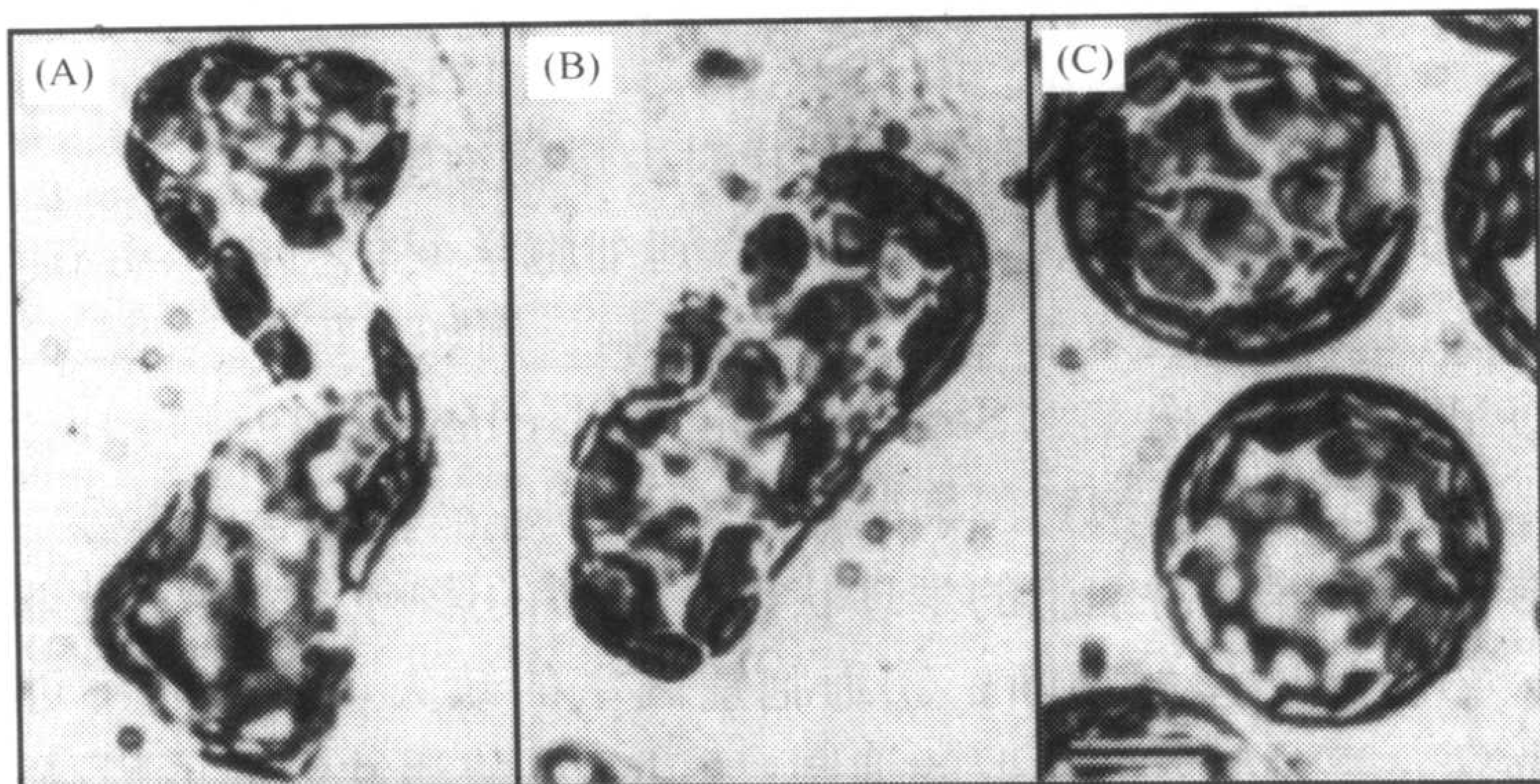


图8.1　白菜叶片原生质体的分离。(A)一个分离的海绵状的叶肉细胞(spongy mesophyll cell)；(B)一个分离的经过果胶酶处理的栅栏细胞。细胞仍保留着纤维素细胞壁。再用纤维素酶处理，最终得到球形的原生质体(C)。比例尺＝ 10 μm。承蒙 Y. Sugimura 允许使用照片，谨致谢意。

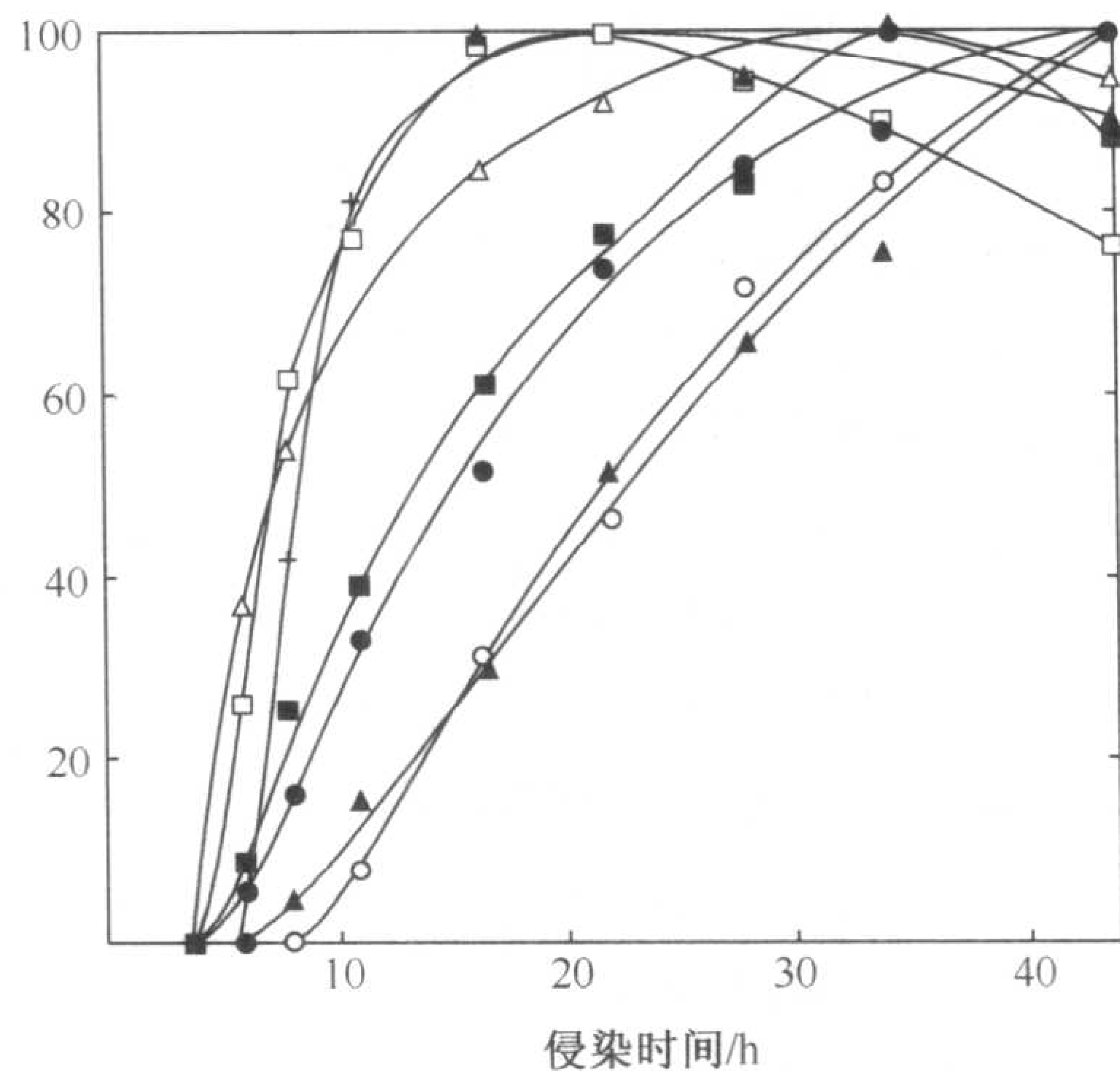


图8.2　同步侵染的原生质体(synchronously infected protoplast)中 TMV 相关的 RNA、蛋白质和子代病毒粒子产生的时程(time course)。同一批原生质体从接种开始就存在放线菌素 D 的情况下，其中一半用[^{14}C]尿苷酸温育；另一半在同样条件下用[^{14}C]亮氨酸温育。在标明的时间取样品进行分析。数据表示为每个组分在时程研究期间达到最大值的百分比。(□) RI；(△)RF；(●)TMV RNA；(■) 外壳蛋白 mRNA；(+) 126 kDa (140 kDa)蛋白质；(▲)外壳蛋白；(○)子代病毒粒子。承蒙版权拥有者(Blackwell Science Ltd.)惠允，引自 Ogawa 和 Sakai(1984)。

生长条件、季节、时间和选取的叶龄不同而显著不同。限定植物生长条件可提高分离原生质体的质量和再生产性（reproducibility）（Kubo *et al.*，1975b）。

（2）在适宜病毒复制的培养条件下，原生质体只能存活 2～3 天，之后就衰退和死亡。

（3）为了避免培养过程中微生物的污染，可向培养基内添加抗生素。这些抗生素可

能对病毒复制产生预想不到的影响［如庆大霉素（gentamycin），Kassanis *et al.*，1975］。

（4）与完整的组织相比，只能制备得到相对少量的细胞。

（5）在受侵染叶片组织的超薄切片中观察到细胞学变化可能不会在原生质体中重现 或许是因为改变的渗透条件对细胞膜的影响。例如，TMV 侵染烟草（Otsuki *et al.*，1972 ）、TYMV 侵染白菜（Sugimura and Matthews，1981）、FLSV 侵染豇豆（vanBeek *et al.*，1985）和 CaMV 侵染芜菁（Yamaoka *et al.*，1982 b）。

（6）分离步骤和培养基对细胞的生理状态有强烈的影响。物理和化学的干扰包括：①部分的脱水；②胞间连丝的切断；③细胞壁区室的缺失，但并非不进行新陈代谢；④细胞电位的逆转；⑤对亮氨酸摄取的抑制；⑥RNA 酶活性大幅度提高；⑦在原生质体被分离后极短时间内开始的纤维素合成和细胞壁再生。此外，还发现烟草叶肉原生质体合成 6 种无法在烟草叶片中检测到的碱性蛋白质。其中 3 种为 1,3-β-葡聚糖酶和在 TMV 侵染的叶片中发现的两种几丁质酶（Grosset *et al.*，1990）（参见第 10 章第Ⅲ节 K.1）。

上述这些变化的结果是，原生质体在被分离后存活期间许多性质随时间而改变。尽管还没有系统性地研究这些变化，但已知道病毒复制的一些特征在完整的叶片和原生质体中并不一致。然而，Föglein 等（1975）指出，当用 TMV 充分侵染的叶片制备原生质体时，旺盛的病毒 RNA 合成被重新起始。当用 TMV 侵染时，含有 *N* 基因的烟草原生质体可避免细胞坏死的命运（Otsuki *et al.*，1972 b）。

在很多使用原生质体的研究中发现，病毒的产量（每个细胞中的病毒颗粒）与完整植物中发现的结果极为相似。例如，Renaudin 等（1975）发现，大白菜原生质体体外侵染后，大约每个细胞产生 10^6 个 TYMV 颗粒。这一数字与已报道的提取侵染完整叶片所获得的 TYMV 产量相接近。这些估计基于这样一种假设：叶片中的所有细胞都已被侵染，并且所有细胞大小相同。然而，如果按照体外研究所用细胞相同种类进行估计（如栅栏叶肉细胞），并且只考虑已被侵染的细胞，那么完整叶片中每个细胞的产量将比原生质体高 10 倍（Sugimura and Matthews，1981）。尽管有这些局限，原生质体系统对我们知识的获得颇有助益，而且将来也会贡献良多。

研究人员做出了很多努力来改进用病毒或病毒的 RNA 侵染原生质体的程序。例如，Watanabe 等（1982）成功地用大单层囊脂质体（unilamellar vesicle liposome）包裹的 TMV RNA 接种了烟草原生质体。另一种称为“电穿孔”（electroporation）的技术已用来将病毒的核酸导入原生质体。电穿孔是对细胞和核酸的混合物施用一短暂的高电压脉冲处理。脉冲使得细胞对核酸有短暂的通透性。它是一个应用广泛的方法，但是其机制还不甚清楚，而且需要确定每个系统的最佳工作条件。例如，Nishiguchi 等（1986）使用该方法将 TMV 和 CMV RNA 侵染烟草叶片原生质体。此方法使以 TMV cDNA 转录产生的低浓度的侵染性的 TMV RNA 易于侵染原生质体（Watanabe *et al.*，1987）。带正电荷的（positively charged）病毒（BMV）可轻易地被电穿孔法诱导侵染，但是带负电荷的（negatively charged）CCMV 只有很低的侵染率（Watts *et al.*，1987）。

培养基中存在一种聚阳离子（polycation）如聚（L）鸟氨酸［poly（L）ornithine］

对于利用病毒 RNA 或具有酸性等电点的病毒侵染是必需的。Takanami 等（1989）报道在培养基中使用聚乙烯亚胺（polyethyleneimine）可极大地提高侵染的效率。

6. 酵母

酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）是一种单细胞生物具有经典和分子遗传学研究的背景资源（参见第 7 章第Ⅲ节 D. 2. e）。虽然酵母是一些病毒和病毒样致病因子的寄主，但尚未发现自然状态下侵染它的 ssRNA 病毒。利用这种生物体提高了我们对 RNA 病毒复制的认识。Janda 和 Ahlquist（1993）研究结果表明，表达 BMV RNA 复制基因 1a 和 2a 的酵母支持依赖于 RNA 的复制和 BMV RNA 3 衍生物的转录。在最初的实验中，他们用 RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的转录物转染酵母原生质球状体，不能检测到 BMV 外壳蛋白的表达，可能由于多个 RNA 共转染的效率很低所致。他们所用的体系含有基于酵母 2 μ 的质粒，这些质粒在酵母 ADH1 启动子和 ADH1 加 poly（A）信号所衍生结构的控制下表达 BMV 1a 和 BMV 2a 基因。利用基于 RNA 3 的结构研究了复制（图 8. 3）（Janda and Ahlquist，1998）。

通过将 RNA 3 构建物上的外壳蛋白基因用氯霉素乙酰转移酶（CAT）或酵母 *URA3* 基因替换，证明了 RNA 3 的复制，产生了含有 RNA 3 的下游基因的亚基因组 RNA 并且表达了这些基因。RNA 3 衍生物（derivative）经过至少几个酵母细胞分裂周期还保持稳定。用半乳糖诱导的酵母 GAL1 启动子控制 RNA 3 的表达，并且在 3′端或附近位置插入自剪切核酶（ribozyme），RNA 3 的表达增加了 45 倍（Ishikawa *et al.*，1997a）。关于利用这一系统获得的 BMV 复制的知识将在第Ⅳ节 E 中详述。

酿酒酵母可能会支持其他一些 RNA 病毒的复制和表达。但因为这个系统的启动子的基本构成与大多数真核生物的不同，它很可能不适用于具有 DNA 基因组的病毒。另外一种酵母　　栗裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*），具有与许多真核生物更类似的启动子系统，因而也许是研究 DNA 病毒更合适的候选酵母。

7. 放射性同位素

使用放射性标记病毒前体物对于病毒复制的很多研究是必需的。有效使用示踪化合物研究植物病毒复制存在许多实际的困难和限制。已使用各种方法将标记的材料导入被研究的组织中。可将整株植物从栽培容器内移出，仔细地洗去根部的土，将同位素施用于根部。该方法对^{32}P 标记的正磷酸盐（orthophosphate）和 ^{35}S 标记的硫酸盐（sulphate）很有效。假定在根部清洗之后立刻施用同位素，则吸收会迅速而有效。就植物如生长活跃的大白菜而言，^{32}P 可在使用后数分钟内在叶片中被检测到，或多或少吸收进入到整株植物可在几小时内完成。就这两种同位素而言，通过根部吸收进入叶片比漂浮在同位素溶液中的叶片组织盘更加有效，即使叶盘被切而露出较多的叶脉末端。把叶片切开的叶柄放置于上述溶液中，可导致变量很大和不规则的同位素吸收。然而，通过仔细地注意生长条件和取样时间安排，可以获得相当高专化性的放射活性［如 1 mCi ^{32}P（3.7×10^7 Bq）/mg 病毒 RNA；Bastin and Kaesberg，1975］。Kopp 等（1981）报道了一种将下部表皮剥取的叶片块漂浮在含有放射性前体物溶液中的方法。有关引入如氨基酸和核苷酸等标记前体物的最好方法的系统研究还未见报道。已有可用

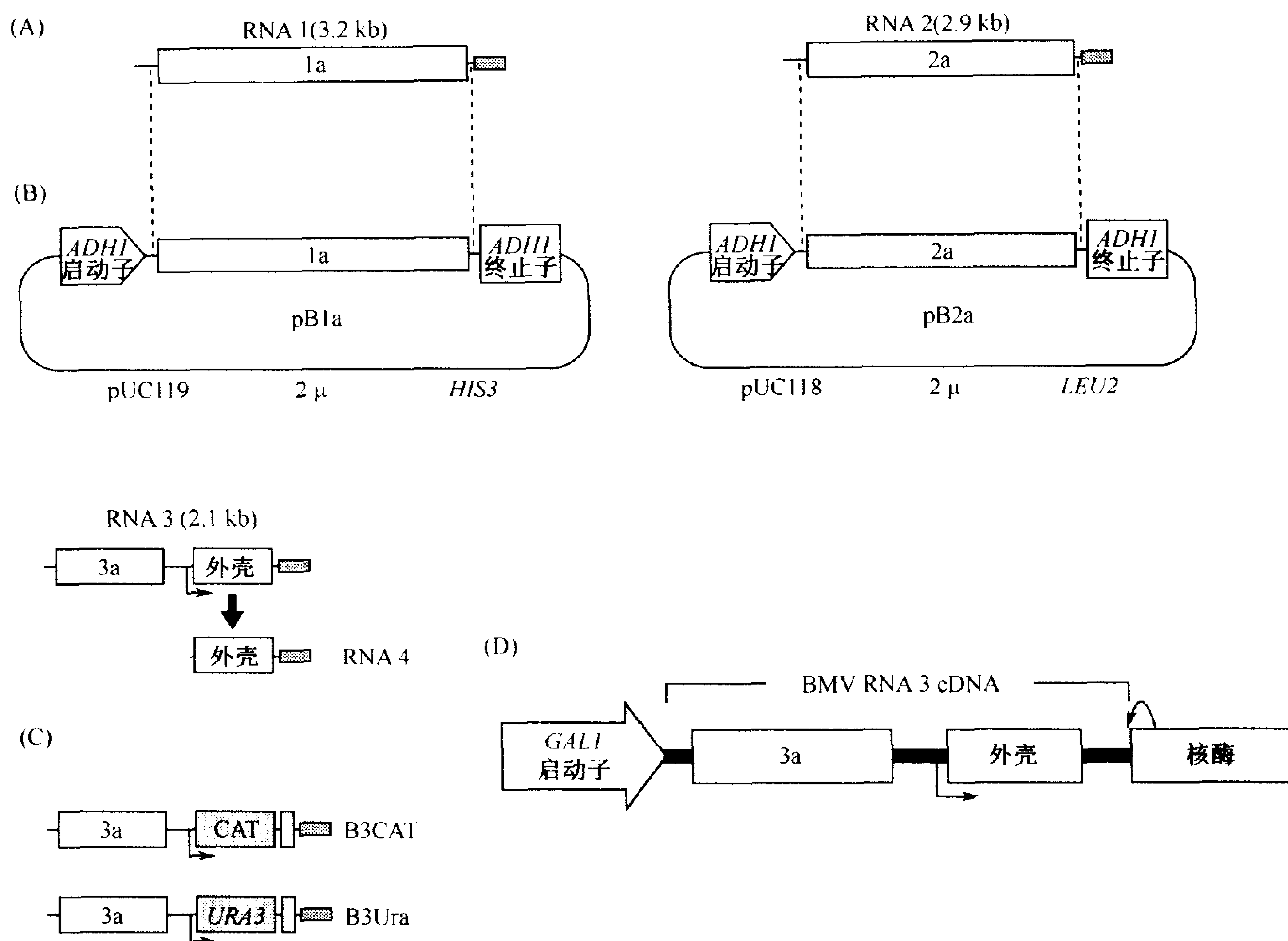


图8.3 用于在酵母中进行复制研究的 BMV 基因组及其衍生物的结构。(A)BMV 基因组 RNA 1、RNA 2和 RNA 3示意图。RNA 4以 RNA 3负链的复制中间体为模板合成具有共同3′端的 mRNA，显示于 RNA 3 的下方。开放的框表示编码1a、2a、3a 和外壳蛋白的 ORF，单线表示和这些基因相邻的非编码区。每条基因组 RNA 3′端的实心框标出了保守的200 nt 的类 tRNA 区，包括负链起始信号。RNA 3上外壳蛋白基因5′上的折箭头标明了 RNA 4 转录起始位点。(B)显示 BMV1a 和2a ORF 以相邻的非编码区短片段被插入到 *ADH1* 启动子和 *ADH1* 转录终止子之间的质粒示意图。也在图中标注了来自 pUC119 和 pUC118序列的相对位点，酵母2 μ 复制起点，以及 *HIS3* 和 *Leu2* 选择标记基因。(C)携带 CAT 或酵母 *URA3* 基因(打点的框)的 BMV RNA 3衍生物的结构。在 B3CAT 和 B3URA RNA 中，除了外壳蛋白基因3′的一部分(表示为残留的短空白框)被检测到之外，其余部分都分别被完整的 CAT 和 *URA3* 基因替换，并分别含有各自基因的一小段3′非编码区序列。(D)酵母着丝粒质粒 B3中 BMV RNA 3 cDNA 的示意图。*GAL1* 启动子融合在 RNA 3的5′端允许 gal 诱导 RNA 3进行体内的转录，并且肝炎 d 病毒核酶在 RNA 3天然的3′端位点切割转录物。承蒙版权所有者(Elsevier Science)惠允，(A)～(C)引自 Janda J 型和 Ahlquist(1993)；承蒙版权所有者(The National Academy of Science，USA)惠允，(D)引自 Janda 和 Ahlquist(1998)。

来将溶液注入叶片内的各种装置（Hagborg，1970；Konate and Fritig，1983）。

大部分植物叶片内存有相当多的低分子质量磷化合物（phosphorus compound）。通过各种不同的处理，可以降低或升高磷化合物的总浓度不超过 2～3 倍。因此，在叶组织中还不能用磷进行有效的脉冲追踪（pulse-chase）实验。对于大多数可被用作标记病毒前体物的有机化合物而言，活性叶片会不间断地提供内源性的补给。而且，植物组织具有以多种不同方式代谢碳化合物的能力，以至于被标记的原子可能很快以大范围的低分子质量化合物形式出现。对于某些特定类型的实验，能够用化学法体外标记纯化病毒达到高度特异性放射比活是非常有用的。对此有多种可行的操作程序可以选择

(Frost 1977; Montelaro and Rueckert, 1975)。

8. 新陈代谢抑制剂

细胞正常新陈代谢中的某些特定过程的抑制剂已被广泛地应用于病毒复制的研究。有三种特别重要的抑制剂：①放线菌素 D，抑制依赖 DNA 的 RNA 合成，但不抑制依赖 RNA 的 RNA 合成；②放线（菌）酮，作为 80S 细胞质核糖体蛋白质合成的特异抑制剂使用；③氯霉素（chloramphenicol），抑制依赖于 70S 核糖体的蛋白质合成（如在叶绿体、线粒体和细菌中）。

必须始终慎重地分析通过使用这些抑制剂所获得的结果，因为它们可能在真核细胞中具有其他多种副作用，从而导致结果很难解释。例如，放线菌素 D 可能影响核苷酸池的大小（Semal and Kummert, 1969），能引起离体叶片对代谢物吸收的大幅增加（Pratt and Matthews, 1971），可能减少浸润叶盘的吸收（Babos and Shearer, 1969），而且可能不抑制寄主某些特定 RNA 的合成（Antignus *et al.*, 1971）。

核酮糖二磷酸羧化酶（ribulose bisphosphate carboxylase）小的多肽片段由细胞质内 80S 核糖体合成，而其大的多肽片段由叶绿体内 70S 核糖体合成。Owens 和 Bruening（1975）在他们的氯霉素和放线（菌）酮对 CPMV 蛋白质合成的影响实验中，采用这两种多肽作为一种理想的内部对照。

9. 新陈代谢的区室化

如果我们根据生物膜结构划分，真核细胞至少有 20 个区室。在植物病毒的复制中，它们通过多种方式适应细胞内代谢多样性所提供的各种机会（参见第 13 章）。在考虑有关病毒复制的试验时（特别是那些涉及使用放射性同位素或新陈代谢抑制剂的实验），我们一定考虑到细胞中发生的各种代谢过程具有高度新陈代谢区室化这一事实。以下列几种形式存在：①在不同类型的细胞中，新陈代谢要适应不同的功能；②个体细胞内存在由膜束缚而成的各种区室，如细胞核、线粒体、叶绿体、溶酶体、过氧化物酶体和液泡；③存在可分离稳定的酶复合物；④依靠蛋白质间的微弱相互作用或一层面附近未被搅动的水层所形成的不需要膜的微环境。

合成和装配的位点

主要有两种常规方法用于尝试明晰细胞内病毒合成和装配的位点：①分级分离组织提取液中的细胞组分，然后化验不同组分中的病毒或病毒组分；②光学和电子显微镜。用细胞分级分离的方法来定位病毒装配位点存在许多困难。

（1）叶绿体是易碎的细胞器，而且总有一部分是破碎的。叶绿体碎片大小覆盖的范围很广，将会污染其他的细胞组分。

（2）许多病毒，如 TMV 发生浓度较高时，几乎肯定会存在于所有的组分中，至少是以少量形式存在。

（3）病毒的特异结构可能非常易碎，并且不能经受住常用的细胞破碎和分离方法。

（4）即使病毒特异结构稳定，它们可能与一个或更多正常细胞器一起分离。

（5）病毒侵染可能改变某些特定细胞器的分离行为。

利用细胞分级分离法研究某些病毒已经取得相当可观的进展。近年来我们通过超微

结构的研究获得了更多的知识，而且更多的场合已经同时应用这两种技术。

属于许多不同属的病毒可导致被侵染细胞的细胞质区域和周围正常的细胞质的发育产生在染色和超微结构特点方面差异。这些结构并没有由清楚和特定的膜结构包围，但通常包括一些内质网和核糖体。它们在大小方面变化较大，甚至可用光学显微镜观察到。不同的病毒变化程度不同，有证据证明这些结构是病毒成分合成和病毒粒子装配的位点。我们使用术语“病毒质”（viroplasm）描述这类内含物。在较早期文献中描述的不规则和“X体”内含物即是此种类型。不同属病毒（参见第3章第Ⅳ节），有时甚至是同属病毒的不同株系的病毒质的细微结构都可能具有高度特异性。很可能是由病毒基因组编码的蛋白质引起了这些特异结构的形成。至于在多数情况下这些结构是如何完成的仍是个未知数。可用免疫细胞化学方法在细胞和组织内定位病毒的编码蛋白质（Stussi-Garaud *et al.*，1987）（图8.4）。

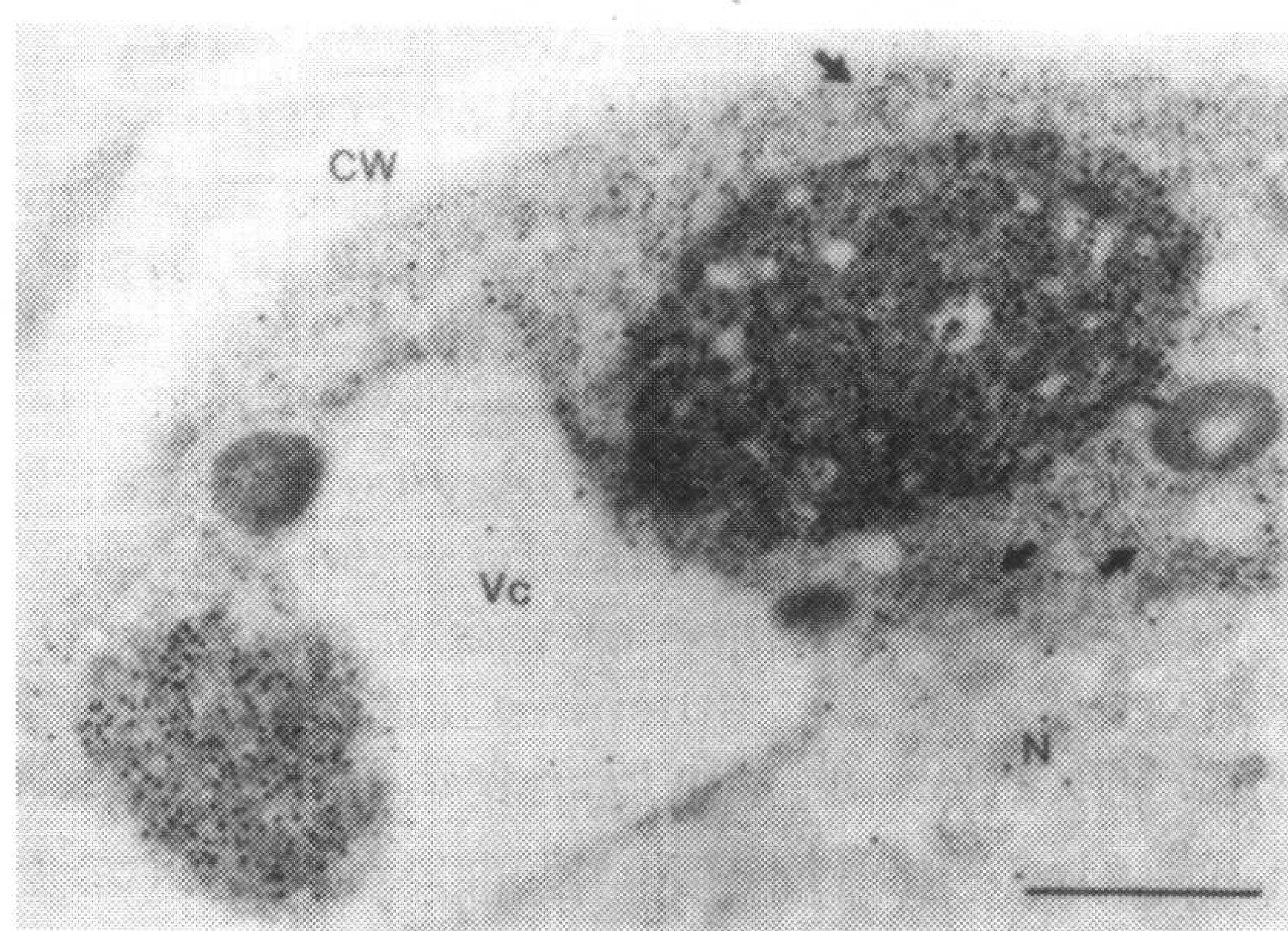


图8.4　在受侵染的烟草幼嫩叶片细胞中对TMV 126（130）kDa-180 kDa蛋白质进行免疫细胞化学定位。叶片超薄切片用一个抗126 kDa-抗180 kDa抗血清处理，然后用A蛋白-金标记复合体处理。金标记强烈定位于细胞质中的病毒质区域。CW＝细胞壁；Vc＝液泡；N ＝ 细胞核；箭头所指为内质网(ER)。比例尺＝ 1 μm。经允许，引自Saito等(1987b)。

B. 体外系统

1. 体外复制系统

已经尝试多种方法从病毒侵染的植物材料中分离复制复合物。存在3个主要的问题：

（1）从正常细胞成分中分离蛋白质和核酸复合物具有一定的困难。分离通常用差速离心和梯度离心完成。利用10%～40%甘油线性梯度，从细胞成分中分离出溶解的TMV复制复合体（Watanabe *et al.*，1999），通过20%～60%蔗糖梯度分离了ToMV的膜结合复合物（Osman and Buck，1996）。

（2）有些膜是正链RNA病毒复制复合体的一个重要组成部分，但分离此类成分的试验技术还不成熟。

（3）未受侵染植物细胞含有常常会增强病毒侵染的内源 RdRp。必须仔细分辨这种活性和病毒编码的活性。

2. 引物延伸

在适当的条件下加入核苷酸三磷酸并且估定在现有模板上的引物链的延伸产物结果，以此研究复制复合物的特性。通过掺入一种被标记的核苷酸三磷酸（放射性或荧光标记）或用标记探针探测，可对产物进行分析。此方法可用于研究复制酶的最适条件。

3. 酶活性

与复制有关的酶可以用标准的蛋白质和酶纯化技术纯化，包括大小排阻层析和离子交换层析。已用标准的酶学技术和其他技术，如活性胶，来研究这些酶的性质。对这些技术的描述超过本书的关注范围，可查阅蛋白质和酶的标准手册。

4. 蛋白质之间的互作

a. 酵母双杂交系统（yeast two-hybrid system）

在用来研究两个蛋白质之间相互作用的系统（Brachmann and Boeke，1997）中，一个蛋白质称为“钓饵”（bait），其基因经克隆及表达融合到一个 DNA 结合域（一般来自 Gal4 或 LexA）；另一个蛋白质称为“猎物”（prey），则与一个转录激活结构域融合（通常来自 Gal4 或反式激活蛋白 VP16）。这两个克隆被引入适宜的酵母菌系中，“钓饵”和“猎物”间的互作使得 DNA 结合域和激活结构域彼此靠近，因而激活下游报道基因（如 *lacZ*、*HIS3*、*LEU2* 或 *URA3*）的表达（图 8.5）。

b. 交联（cross linking）

用化学或紫外线处理可使蛋白质之间或蛋白质与核酸之间发生交联（Ausubel *et al.*，1998）。化学交联剂的大小能给出有关蛋白质间距离的信息。

c. 蛋白质夹心印迹（sandwich blot）

在改进的蛋白质印迹（Western blotting）实验中，固定在膜上的蛋白质可由一种抗血清检测，第二种蛋白质能与先前固定于膜上的第一种蛋白质结合，然后就能被第二种蛋白质的特异抗血清检测出来。该方法可用于蛋白质之间互作的研究。然而，必须认识到，将第一种蛋白质固定于膜上可能会改变它的构象或使蛋白质结合位点隐藏起来。

5. 蛋白质-核酸互作

a. 酵母三杂交系统（yeast three-hybrid system）（Brachmann and Boeke，1997）

此系统可以研究 3 个搭档组分之间的互作，包括三种蛋白质：一个组分通过酪氨酸激酶的磷酸化作用、跨膜受体的细胞外结构域或 RNA-蛋白质互作对搭档进行功能激活。最后一种需要两个相互作用的蛋白质和一个相互作用的杂合 RNA。杂合 RNA 的一部分参与已知的相互作用，而另一部分用于筛选 RNA 结合蛋白（图 8.5）。这些相互作用把各组分聚集在一起，同上文所述双杂交系统一样激活下游的报道基因。

b. DNA 和 RNA 足迹（footprint）

此试验的基础是 DNA 或 RNA 与蛋白质结合后可以免于被 DNase 或 RNase 降解。

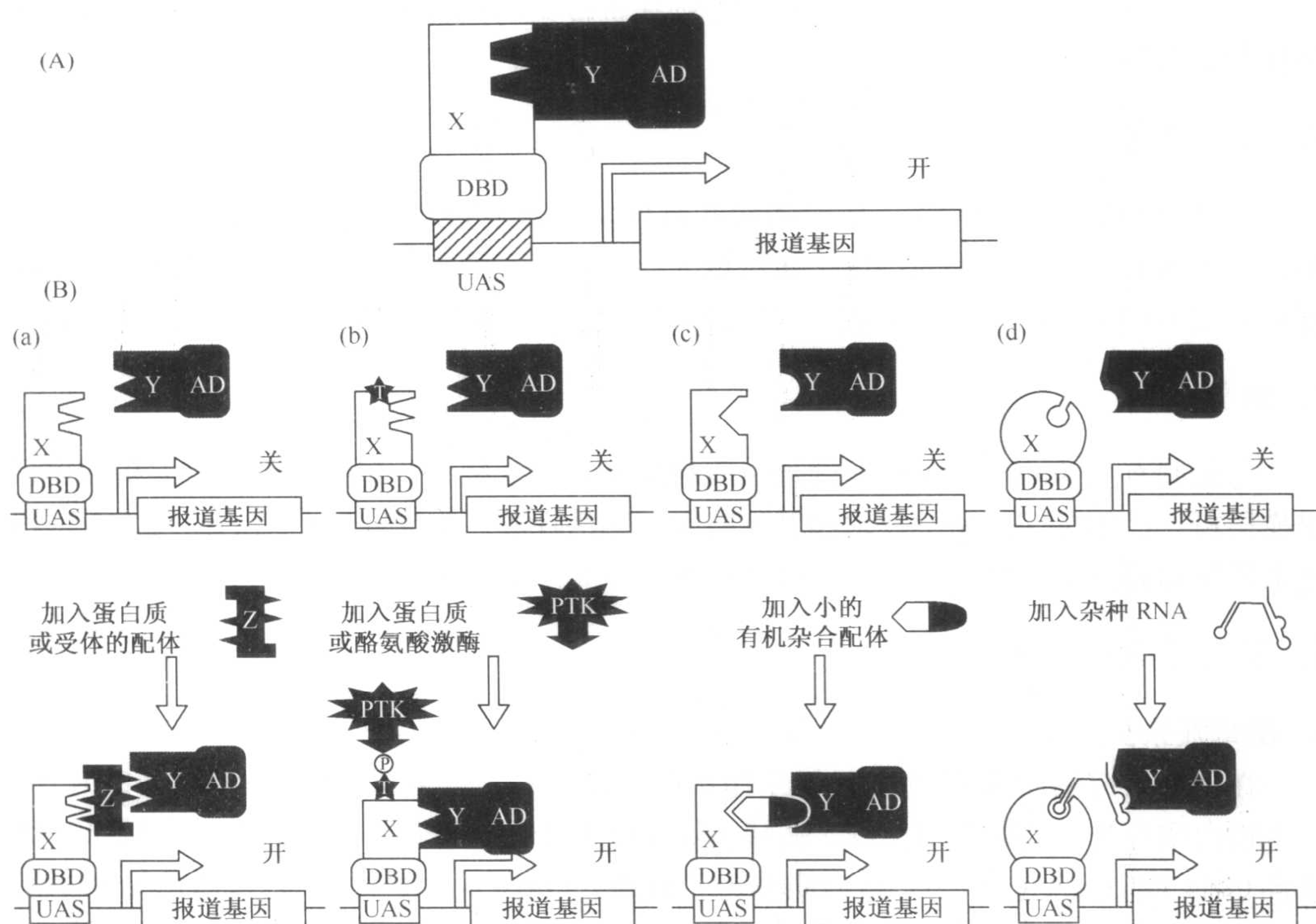


图8.5 (A)酵母双杂交系统。将编码钓饵蛋白 X 的基因融合到一 DNA 结合域(DBD);猎物蛋白 Y 的基因融合到一个激活结构域(AD)。由于蛋白质 X 和 Y 的互作而将 DBD 与 AD 联在一起,从而激活下游报道基因(如 *lacZ*、*HIS3*、*LEU2* 或 *URA3*)的转录。(B)酵母三杂交系统的一些例子。所有可以被分析或筛选的系统构成成分均用涂黑框表示。(a)蛋白质和肽配体3HS 需要第3种搭档分子。Z,用于蛋白质 X 和蛋白质 Y 形成稳定的复合体。这些搭档分子也许是结合于蛋白质 X 和 Y 的桥梁蛋白,因而使它们转变为正确的构象;或者是肽配体导致两个细胞外受体结构域结合成二聚体。(b)激酶3HS 与(a)相关:互作的两组分之一 X 的构象变化通过酪氨酸(T)被酪氨酸激酶磷酸化完成;(c)小的配体3HS 利用二聚化作用(CID)的化学诱导物研究受体及其小的有机配体。关键特点是一杂种配体:它的一部分是 FK506,可被结合蛋白 FKBP12识别;第二部分是一个已知可以用于筛选或受体突变分析的小配体。第二部分也可以是一个配体文库,用来分离单一受体 Y 的配体。(d)RNA 3HS 需要两个杂合蛋白和一个杂种 RNA 才能显出表型。概念上与(c)相似,杂种 RNA 的一半作为"钓饵",作为一个已知 RNA-蛋白质互作的部分;另一半可被用来分析或筛选 RNA 或与 RNA 结合的蛋白质。经允许,引自 Brachmann 和 Boeke(1997)。

受保护的 DNA 或 RNA 片段通过变性凝胶电泳分离,用测序或放射自显影等技术进行分析。每个蛋白质结合位点的结合曲线可以给出定量的信息,并且可以鉴定出协调互作的位点(Ausubel *et al.*, 1998)。

c. 凝胶迁移率变动分析(gel mobility shift)

此试验使用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,提供一个简单、迅速和敏感的检测已结合了核酸的蛋白质的方法。结合蛋白质后会阻碍核酸片段在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移率,可通过比较已处理和未处理过的核酸片段的迁移率进行检测。迟滞的片段对应于相应的蛋白质-核酸复合体个体,可用来鉴定纯化的特异蛋白质,或粗提纯物中特性未明的蛋白质。该技术可用于研究蛋白质-核酸互作的特性,如亲和力和结合特异性(Aus-

ubel *et al.*, 1998)。

d. RNA-蛋白质印迹（North-Western blot）

在 RNA-蛋白质印迹分析中，利用凝胶电泳分离欲研究的蛋白或核酸并转印到一个膜上。然后用相对应的核酸或者蛋白质对该膜进行探测，并用核酸上的标记或用该蛋白质的抗血清等相应方法检测 RNA-蛋白质的结合。如同蛋白质夹心印迹（sandwich blot）一样，应该记住膜上的固定也许会改变这些大分子的构象。

第Ⅳ节　正义单链 RNA 病毒的复制

将近有 50 个属的正链 RNA 植物病毒的基因组已经被确定，但我们只对其中极少数病毒的复制有全面的了解。然而，所有具有这种基因组结构的病毒拥有基本相同的复制策略，尽管在细节上可能存在差异。

正义 RNA 基因组复制的基本机制是，病毒编码的复制酶以正链为模板合成互补的负链，然后以负链为模板合成新的正链。新生 RNA 的合成是从模板的 3′→5′端。复制在复制复合体中进行，复制复合体包括模板、新合成的 RNA、复制酶和寄主因子。这些问题将依次讨论，并详细介绍一些研究较多的病毒系统。

A. 病毒的模板

已经从 RNA 合成系统中分离出两类 RNA 结构。一类称为复制型（replicative form，RF），是完全配对的双链结构，具体的功能尚不确定。如它可能作为终止复制的 RNA 分子。另一类被称为复制中间体（replicative intermediate，RI），仅有部分双链并且包含一些单链尾部（新生产物链）（图 8.6）。

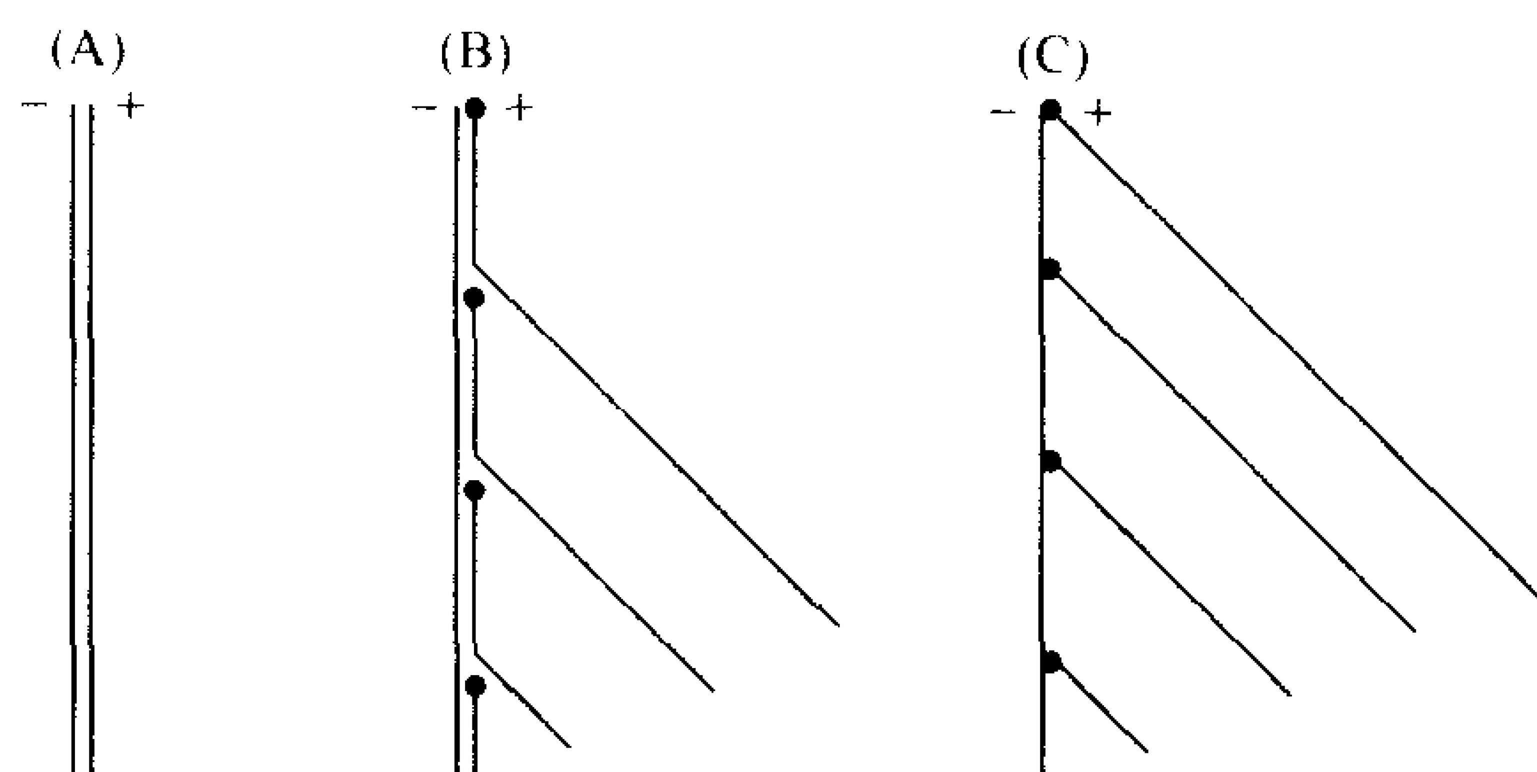


图8.6　病毒正链和负链 RNA 结合的形式。(A)复制型(RF)具有全长正链和负链的碱基配对结构；(B)复制中间体(RI)具有部分碱基配对结构，具有聚合酶分子(●)和新生子代正义单链尾巴；(C)RI 在体内的可能的真实结构状态。子代正链和模板负链几乎完全是单链。经允许，引自 Matthews(1991)。

实际上，这种结构和病毒 RNA 的复制有紧密联系。一般认为，分离到的 RI 来源于如图 8.6（C）所示的结构，通过部分新合成链和模板退火而成。

被侵染细胞中分离到 RI 和 RF 两种分子都表现为双链形式特性。这些结构在被侵

染细胞中的性质还不为人知，但认为双链 RNA 在植物防御反应中具有重要意义（参见第 10 章第Ⅳ节）。这些双链分子在体内很可能是以单链形式存在，通过区室化或结合蛋白质保持双链彼此分开。细胞学证据表明 TYMV 的 RI 实际上是单链形式（参见第Ⅳ节 K.4）。

病毒基因组正链和负链形式都包含控制复制的特异性和时序的信号。

调控信号

许多调控信号可能位于模板链的 3′端，可是应该认识到在模板链的其他区域也含有远距离信号，或 3′端能与 RNA 上其他区域相互作用。已经证明正链的 3′端对于负链合成很重要（Dreher，1999）。如第 4 章第Ⅲ节 A.3.c 中所述，在植物病毒 RNA 3′端存在 3 种基本结构：类 tRNA 结构、poly（A）尾和非 tRNA 杂聚物序列。Dreher（1999）指出，在 RNA 3′端结构和 RdRp 超组（supergroup）划分之间没有真正的相关性（见下文），这可能表明不同的 3′端有类似的功能。

3′端含有类 tRNA 序列病毒的负链合成通过插入一个与在正模板链 3′端多数为碱基 C 相对应 GTP 而起始（Dreher，1999）。具有其他 3′端结构的模板如何起始负链合成还不清楚。一般认为，3′端为复制酶复合体提供一个特异结合位点，从而形成复制复合体。

在转基因植物中表达 LMV 的 3′非翻译区，当被马铃薯 Y 病毒属其他病毒，如 PepMoV、TEV 或 TVMV，侵染时，可以用作 LMV 的负链 RNA 合成的模板，但在被 CMV 侵染时则不可以（Teycheney *et al.*，2000）。当用 TAV 侵染表达 CMV 3′端的植物时，CMV 的负链 RNA 可以被合成。因此，马铃薯 Y 病毒属病毒和黄瓜花叶病毒属病毒的复制酶复合体具有识别同属病毒异源的 3′非翻译区的能力。

正链的 5′端（即负链模板的 3′端用于正链合成）变化较大，并且对于特异起始正链合成而言没有提供明显的导向。通常认为，特异性由负链的起始和合成提供，而且负链和正链的合成是偶联的。

B. 复制酶（Ishihama and Barbier，1994；Buck，1996）

3 种或更多病毒编码的酶活性参与正链 RNA 病毒的复制，即依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（RdRp）、解旋酶和甲基转移酶活性。这些酶整体被称为病毒的复制酶，但是有时该术语被误用为 RdRp。尽管这些活性的许多功能还没有被正式验证，但在学术上，它们应该被称为类 RdRp、类解旋酶和类甲基转移酶。但为了简洁，本书仍将使用它们的功能定义。

1. 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶

依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（RdRp）以 RNA 为模板催化 RNA 的合成。此酶的两个特性使得该酶活性很难研究。首先，在细胞中它通常和膜结构结合，分离时经常变得不稳定。因此，很难充分地纯化到这些酶，以满足任何病毒编码多肽的阳性鉴定的需要。其次，健康的植物组织在细胞的可溶性组分中可能含有少量的具类似酶活性的酶。这种酶活性的量可能受病毒侵染激发。

Kamer 和 Argos（1984）鉴定了 RdRp 特性的多种氨基酸序列模体（motif）。其中最保守的是一个 Gly-Asp-Asp（GDD）模体，且其两侧主要是疏水氨基酸的片段，并能与 Mg^{2+} 结合。暗示了这样一种结构：由一个暴露的含 GDD 模体的短环所连接的两个反向平行 β 折叠链。进一步通过比较不同 RdRp 序列，已经确认了 8 个模体（Poch *et al.*，1989；Koonin，1991；Koonin and Dolja，1993）。据此，RdRp 被分成 3 个超组（supergroup）。超组 1 被称为“微小 RNA 病毒属”组，超组 2 为“香石竹斑驳病毒属”组，超组 3 为“甲病毒属”组。超组涵盖了不同的病毒属，包括侵染脊椎动物、植物和细菌的病毒，在每个超组内都有植物病毒的典型代表（表 8.1）。

表 8.1 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（RdRp）超组与植物病毒属*

超组 1 小 RNA 病毒超组 （picornavirus supergroup）	超组 2 香石竹斑驳病毒超组 （carmovirus supergroup）	超组 3 甲病毒超组 （alphavirus supergroup）	
Comovirus	*Aureusvirus*	*Alfamovirus*	*Ilarvirus*
Enamovirus	*Avenavirus*	*Allexivirus*	*Marafivirus*
Polerovirus	*Carmovirus*	*Bromovirus*	*Oleavirus*
Potyvirus	*Dianthovirus*	*Capillovirus*	*Pecluvirus*
Sequivirus	*Luteovirus*	*Carlavirus*	*Pomovirus*
Sobemovirus	*Machlomovirus*	*Closterovirus*	*Potexvirus*
	Necrovirus	*Crinivirus*	*Tobamovirus*
	Panicovirus	*Cucumovirus*	*Tobravirus*
	Tombusvirus	*Foveavirus*	*Trichovirus*
	Umbravirus	*Furovirus*	*Tymovirus*
		Hordeivirus	*Vitivirus*
		Ideaovirus	

* 表中病毒属的中文译名见附录 2A。

每个超组的成员都有一些共同的性质。超组 1 成员的特点是通常只有一条基因组片段，具有 5′-VPg，以多聚蛋白的形式表达遗传信息。超组 2 和 3 的成员拥有一个到多个基因组片段，RNA 通常加帽，每个基因单独翻译。

脊髓灰质炎病毒（poliovirus）（超组 1）的 RdRp 的三维结构已经通过 X 射线晶体分析法确定（Hansen *et al.*，1997）。该酶的总体结构与其他的聚合酶（依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶、依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶和反转录酶）类似，可以比作人的右手。与其他三种酶一样，手掌的结构域包含催化中心。但手指结构域不同于其他聚合酶。用神经网络（neural net）PHD（海德尔堡的预测软件 Predict，Rost *et al.*，1994）分析，O'Reilly 和 Kao（1998）计算机法预测了 BMV、TBSV 和 TMV 的 RdRp 的二级结构，并把预测结果与脊髓灰质炎病毒 RdRp 结构进行比较。该分析指出，超组 2 和超组 3 病毒的 RdRp 与超组 1 脊髓灰质炎病毒的具有类似的结构，都包含一个 RdRp 特有的结构域。

在未被侵染的植物中也有 RdRp 活性出现，曾经被认为参与 RNA 病毒复制。具有该活性的酶已分离出来，编码该酶的 cDNA 已被克隆，可编码一个 128 kDa 蛋白质（Schiebel *et al.*，1993；1998）。

2. 解旋酶（Kadarei and Haenni，1997；Bird *et al*.，1998）

解旋酶是依赖于多核苷酸的核苷三磷酸（NTP）磷酸酶，具有置换（displacing）ssDNA 和（或）RNA 的活性。它们通过置换核苷酸双链中的互补链和可能消除核酸模板的二级结构，在基因组复制和重组中发挥关键作用。一些解旋酶需要 3′端为单链核苷酸，而另一些需要 5′端为单链；分别称作 3′→5′ 解旋酶和 5′→3′解旋酶。

基于保守的氨基酸序列模体，解旋酶被划分为数个超家族。Gorbalenya 和 Koonin（1993）确定了 5 个超家族，其中 3 个是典型的正链 RNA 病毒。超家族Ⅰ和Ⅱ有 7 个保守的模体，而超家族Ⅲ只有 3 个模体。3 个超家族共有的两个模体，是不同的 ATP 结合模体，并含保守序列：GXXXXGKT/S 和 ϕϕϕϕD，此处 X 代表任意氨基酸，ϕ 是疏水残基。超家族Ⅰ～Ⅲ的大多数成员属于 3′→5′解旋酶。表 8.2 给出了各种不同植物病毒属的超家族。

表 8.2　解旋酶超家族与植物病毒属

超家族Ⅰ	超家族Ⅱ	超家族Ⅲ	无模体
苜蓿花叶病毒属 *Alfamovirus*	大麦黄花叶病毒属 *Bymovirus*	豇豆花叶病毒属 *Comovirus*	绿萝病毒属 *Aureusvirus*
甜菜坏死黄脉病毒属 *Benyvirus*	马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus*	伴生病毒属 *Sequivirus*	燕麦病毒属 *Avenavirus*
雀麦花叶病毒属 *Bromovirus*		矮化病毒属 *Waikavirus*	香石竹斑驳病毒属 *Carmovirus*
发样病毒属 *Capillovirus*			香石竹病毒属 *Dianthovirus*
香石竹潜隐病毒属 *Carlavirus*			黄症病毒属 *Luteovirus*
长线病毒属 *Closterovirus*			玉米褪绿斑驳病毒属 *Machlomovirus*
毛形病毒属 *Crinivirus*			坏死病毒属 *Necrovirus*
黄瓜花叶病毒属 *Cucumovirus*			黍花叶病毒属 *Panicovirus*
真菌传杆状病毒属 *Furovirus*			马铃薯卷叶病毒属 *Polerovirus*
大麦病毒属 *Hordeivirus*			南方菜豆花叶病毒属 *Sobemovirus*
悬钩子病毒属 *Idaeovirus*			番茄丛矮病毒科 *Tombusvirus*
等轴不稳环斑病毒属 *Ilarvirus*			
马铃薯 X 病毒属 *Potexvirus*			
烟草花叶病毒属 *Tobamovirus*			
烟草脆裂病毒属 *Tobravirus*			
纤毛病毒属 *Trichovirus*			
芜菁黄花叶病毒科 *Tymovirus*			

丙型肝炎病毒（Hepatitis C virus）RNA 解旋酶（超家族 Ⅱ）的晶体结构已经被解析，并且其解旋双链 RNA 的机制已被提出（Cho *et al*.，1998）。其结构由 3 个结构域组成一个 Y 形分子。一条裂缝把 RNA 结合域与 NTP 酶和另一个结构域分开，而 ssRNA 在裂缝中可被模拟（做成模型）。人们提出了由该蛋白质的二聚体使 dsRNA 的一条链穿过两个分子的裂缝形成的通道，而另一条链位于二聚体外面这种方式来解旋 dsRNA。因为不同超家族间存在保守的模体，所以丙肝病毒解旋酶的特性很可能也适用于植物病毒的解旋酶。

一些植物病毒属看来缺乏解旋酶典型的 NTP 结合模体（表 8.2），因此，已经提出了几种可能的原因（Buck，1996）：

（1）很可能是因为 NTP 结合模体变异太大，以至于不能从氨基酸一级序列中识别出来。

（2）病毒的聚合酶可能有解旋活性。

（3）解旋可能是由一个解螺旋蛋白完成，即在无 NTP 水解条件下利用蛋白质结合 ssRNA所产生的化学能量能使双螺旋变性。

（4）病毒可能利用寄主的解旋酶。

从表 8.3 可知，一些病毒在其基因组的其他位置还编码了另外一个解旋酶活性区。一般认为，甜菜坏死黄脉病毒属、大麦病毒属和马铃薯 X 病毒属病毒的额外的解旋酶与细胞间运动有关（参见第 9 章第Ⅱ节 D.2）。

3. 甲基转移酶活性（Schuman and Schwer，1995）

甲基转移酶活性导致 RNA 5′加帽现象在第 4 章（第Ⅲ节 A.3.c）中已叙述过。

4. 病毒可读框上功能域的结构

表 8.3 中列出了正链植物病毒属中存在或识别出的病毒复制酶的上述 3 个功能域。可以看出，并不是所有属都具有这 3 个结构域，对此存在几个原因：

（1）只有具有 m^7G 5′帽子的病毒需要甲基转移酶活性。有一些病毒（如真菌传杆状病毒属和花生丛簇病毒属）被认为具有加帽的 RNA，但未找到甲基转移酶活性结构域。此外，一些病毒属的 RNA 5′端的结构尚未被确定。

（2）在番茄丛矮病毒科、南方菜豆花叶病毒属和幽影病毒属中，其解旋酶结构域尚未识别出来（参见第Ⅳ节 B.2）。

对于所有以多聚蛋白或融合蛋白（由移码或通读产生）形式表达基因组的病毒，蛋白质结构域多以甲基转移酶、解旋酶和 RdRp 的顺序排列（N 端到 C 端）；在多组分基因组中不以这种顺序分布。然而，许多病毒属都有一个共同特征，即甲基转移酶和解旋酶的结构域可以都是与 RdRp 结构域分离的。甲基转移酶和解旋酶结构域可以在一个可读框中表达，RdRp 由与之分离的可读框表达，或是由移码或通读的方式分开的两个相邻的可读框编码；或以多聚蛋白形式表达，再由蛋白酶切开（表 8.3）。然而，在发样病毒属和玉米细条病毒属病毒中，蛋白酶结构域位于甲基转移酶和另外两个结构域之间。在其中 6 个病毒属中 3 个结构域看来不是分离的。

对于许多病毒而言，甲基转移酶和解旋酶结构域出现在同一个蛋白质上。然而，尽

管 BYV 的这两个活性在同一 ORF 中表达，但用单克隆抗体检测被侵染的植物提取物时显示，295 kDa 蛋白质在体内被切割成一个含甲基转移酶结构域的 63 kDa 蛋白质和一个含解旋酶结构域的 100 kDa 蛋白质（Erokhina *et al.*，2000）。

表 8.3　在正链 RNA 复制的 ORF 内功能域的结构

病毒属	MT	Hel	RdRP	与 RdRP 分离的 MT 和 Hel			备注
				不同的 ORF	RT 或 FS	蛋白酶	
雀麦花叶病毒属 *Bromovirus*	+		+	+			
苜蓿花叶病毒属 *Alfamovirus*	+	+	+	+			
黄瓜花叶病毒属 *Cucumovirus*	+	+	+	+			
等轴不稳环斑病毒属 *Ilarvirus*	+	+	+	+			
油橄榄潜隐病毒属 *Oleovirus*	+	+	+	+			
豇豆花叶病毒属 *Comovirus*		+	+			+	
蚕豆病毒属 *Fabavirus*		+	+			+	
线虫传多面体病毒属 *Nepovirus*		+	+			+	
马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus*		+	+			+	
大麦黄花叶病毒属 *Bymovirus*		+	+			+	
番茄丛矮病毒属 *Tombusvirus*		—	+				
绿萝病毒属 *Aureusvirus*		—	+				
燕麦病毒属 *Avenavirus*		—	+				
香石竹斑驳病毒属 *Carmovirus*		—	+				
香石竹病毒属 *Dianthovirus*		—	+				
玉米褪绿斑驳病毒属 *Machlomovirus*		—	+				
坏死病毒属 *Necrovirus*		—	+				
黍花叶病毒属 *Panicovirus*		—	+				
伴生病毒属 *Sequivirus*		+	+			+	
矮化病毒属 *Waikavirus*		+	+			+	
长线病毒属 *Closterovirus*	+	+	+		+		

续表

病毒属	MT	Hel	RdRP	与RdRP分离的MT和Hel			备注
				不同的ORF	RT或FS	蛋白酶	
毛形病毒属 *Crinivirus*	+	+	+		+		
黄症病毒属 *Luteovirus*		+	+		+		
马铃薯卷叶病毒属 *Polerovirus*		+	+		+		
耳突花叶病毒属 *Enamovirus*		+	+		+		
烟草花叶病毒属 *Tobamovirus*	+	+	+		+		
烟草脆裂病毒属 *Tobravirus*	+	+	+		+		
马铃薯X病毒属 *Potexvirus*	+	+	+				MT、Hel和RdRP不分离
香石竹潜隐病毒属 *Carlavirus*	+	+	+				同上
葱X病毒属 *Allexivirus*	+	+	+				同上
发样病毒属 *Capillovirus*	+	+	+			+	蛋白酶将MT与Hel/RdRP分开
凹陷病毒属 *Foveavirus*	+	+	+				MT、Hel和RdRP不分离
纤毛病毒属 *Trichovirus*	+	+	+				同上
葡萄病毒属 *Vitivirus*	+	+	+				同上
真菌传杆状病毒属 *Furovirus*	?	+	+		+		
花生丛簇病毒属 *Pecluvirus*	?	+	+		+		
马铃薯帚顶病毒属 *Pomovirus*	+	+	+		+		
甜菜坏死黄脉病毒属 *Benyvirus*	+	+	+			+	
大麦病毒属 *Hordeivirus*	+	+	+	+			解旋酶也在βb上
玉米细条病毒属 *Marafivirus*	+	+	+			+	蛋白酶将MT与Hel/RdRP分开
南方菜豆花叶病毒属 *Sobemovirus*		—	+				
芜菁黄花叶病毒属 *Tymovirus*	+	+	+			+	
悬钩子病毒属 *Idaeovirus*	+	+	+				MT、Hel和RdRP不分离
幽影病毒属 *Umbravirus*	—	—	+				

注：MT、甲基转移酶（methyl transferase）；Hel、解旋酶（helicase）；RdRp、依赖于RNA的RNA聚合酶；RT、通读（readthrough）；FS、译码（frameshift）。

C. 复制的位点（Buck，1996）

随着技术的进步，特别是在被侵染细胞中定位病毒特异基因产物和核苷酸的技术发展，使确认病毒复制的位置成为可能。一般认为正链 RNA 病毒的复制与细胞膜相关。虽然只有少数例证（参见第Ⅳ节 E.4 和 H.6），但有两个事实支持这一联系的普遍性。第一，也是唯一的例子是 CMV 能在植物组织的可溶性复制提取物中完成全基因组的复制（Hayes and Buck，1990）。一般而言，在这样的提取物中只有互补链能被合成。而在 CMV 这个例子中，体外复制效率非常低，而且从正链到负链的比率远低于体内的复制（Hayes and Buck，1990）。第二，许多病毒的侵染会扰乱膜结构，经常导致小泡（vesicle）的形成，已验证的例子显示这一过程与复制复合体相关。多种膜结构参与了小泡的形成（表 8.4）。从表 8.4 可以看出，相关的膜和复制酶超组之间，甚至与病毒家族之间似乎没有任何相关性。

病毒侵染循环涉及的膜结构将在第 13 章中进一步讨论。

表 8.4　可能与正链 RNA 病毒复制相关膜结构的实例

膜的类型	病毒	参考文献
内质网	BMV	Restrepo-Hartwig 和 Ahlquist（1996）
	TMV	Heinlein 等（1998）；Reichel 和 Beachy（1998）
	CPMV	Carette 等（2000）
叶绿体外膜	TYMV	Reviewed in Garnier 等（1986）
	AMV	de Graaf 等（1993）
液泡膜	CMV	Hatta 和 Francki（1981b）
过氧化物体	TBSV	Russo 等（1983）；Lupo 等（1994）
线粒体	CIRV	Rubino 等（1995）
	TRV	Harrison 和 Roberts（1968）
细胞核	PEMV	Demler 等（1994a）

D. 复制的机制

RF 和 RI RNA 被认为提供了有关 RNA 复制机制的证据。一般认为，RF 发生于以一个正链为模板的负链的起始合成。RI RNA 包含的正链通常多于负链（Aoki and Takebe，1975），这表明每一个 RI RNA 是一条负链结合了多条正链（图 8.7）。

关于正链合成的机制有两个假说。半保留机制认为，新合成的链被将要合成的链完全替换［图 8.7(B)］，在全保留的机制中，提出两条 RNA 仅仅在新生链衍生的末端瞬时解旋［图 8.7(C)］。多数证据支持半保留的机制（Buck，1999）。

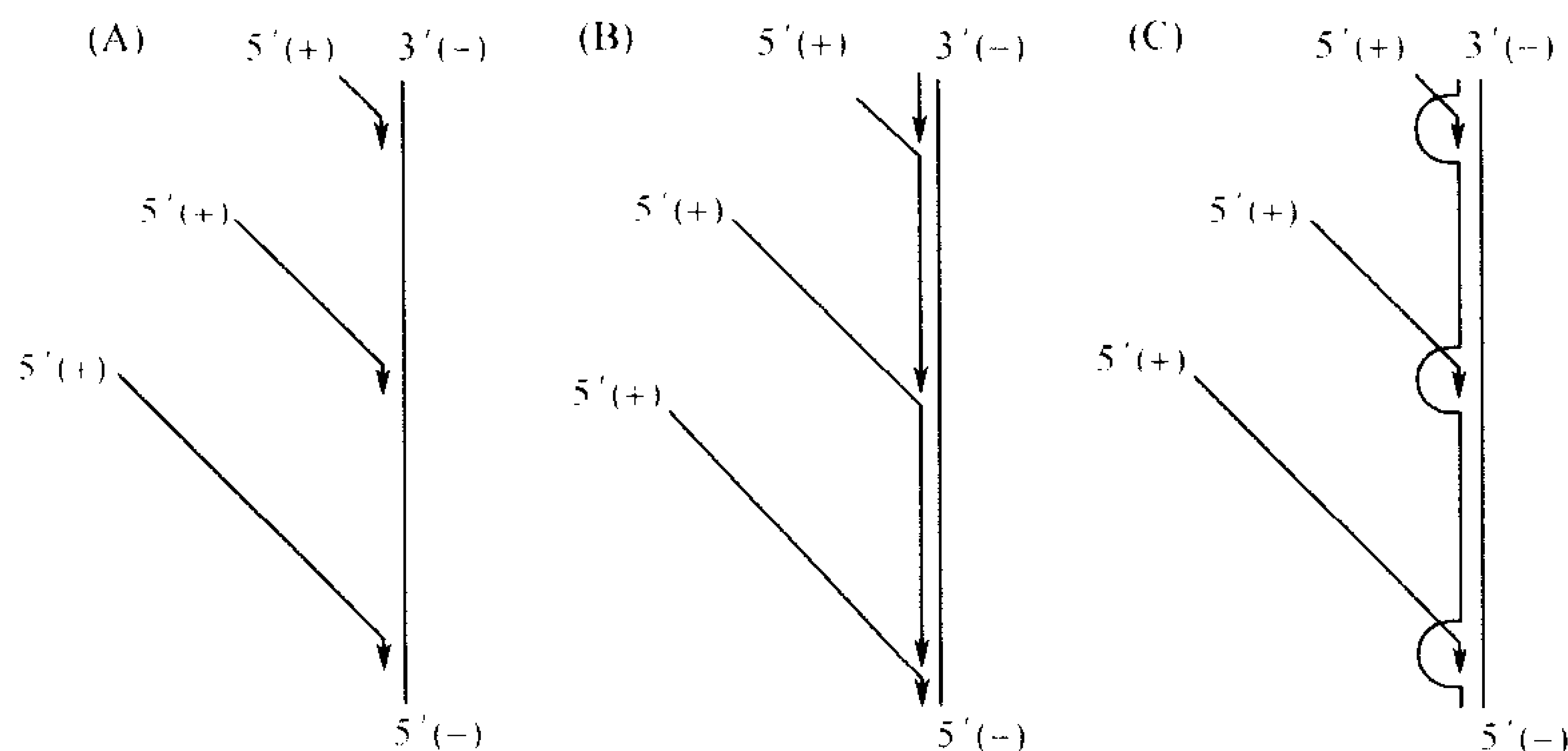


图8.7 TMV复制中间体(RI)RNA 3种可能的结构。承蒙版权所有者(The Royal Society)惠允，引自Buck (1999b)。

E. 雀麦花叶病毒（BMV）的复制

1. BMV的体内复制

a. 侵染的过程

在Kurtz-Fritsch和Hirth（1972）的实验中，17%的BMV接种物是在接种20 min之后脱壳。脱壳导致病毒低分子质量蛋白质的出现而不是空的衣壳。当前关于BMV和其他雀麦花叶病毒属病毒粒子脱壳机制的内容已在第7章第Ⅱ节C中论述过。

b. 侵染的时程

在BMV对大麦原生质体的体外侵染实验中，一种与膜结合的RNA聚合酶抵抗放线菌素D的活性比未侵染的提高到了30倍（Okuno and Furusawa，1979）。在此系统中，RNA 1和RNA 2在侵染后6 h可检测到。4条RNA在侵染10 h时出现。所有4条RNA的双链结构产生的时程与单链结构的类似（Loesch-Fries and Hall，1980）。在16～25 h RNA的合成达到最大量。病毒粒子的形成在接种后10～25 h达高峰。

在CCMV侵染豇豆嫩叶中，侵染过程通过不同温度处理实现同步，侵染过程中以相对恒定的比例合成3条大RNA（Dawson，1978b），但是在侵染早期产生很少的RNA 4。随着侵染发展，RNA 4的比例持续增长。RNA 1、RNA 2和RNA 3的RF的产生与相应ssRNA的产生有类似的动力学过程。

2. 复制蛋白质

BMV的基因组分为3种RNA（参见第6章第Ⅶ节A.1基因组结构部分）。RNA 1和RNA 2编码RNA复制所必需的反式作用因子，而且在大麦原生质体中能不依赖于RNA 3进行复制（Kiberstis *et al.*，1981；French *et al.*，1986；Dinant *et al.*，1993）。RNA 1和RNA 2分别编码蛋白质1a和2a，这两个蛋白质在BMV侵染的植物中复制酶制备物内得到确认（Horikoshi *et al.*，1988；Quadt *et al.*，1988）。蛋白质1a包含甲基转移酶和解旋酶模体，蛋白质2a含有RdRp模体。

Kao等（1992）证明了蛋白质1a和2a在体外形成一个复合体：①它们共纯化的产

物具有聚合酶活性；②在兔网状细胞裂解液或昆虫细胞中表达时，它们能被特异的抗血清共同沉淀；③蛋白质 1a 可以结合固定在尼龙膜上的蛋白质 2a；④在蛋白质 1a 中插入 3 个氨基酸会破坏 BMV 在体内的复制，同时也阻断了在体外与蛋白质 2a 的互作。这些观察结果很符合之前的遗传学观察结果（Allison *et al.*，1988；Traynor and Ahlquist，1990），说明体外发现的这种互作在体内也是存在的。互作发生在蛋白质 2a N 端的 115 个氨基酸区域与蛋白质 1a 内含有解旋酶功能域的 50 kDa 区域之间（Kao and Ahlquist，1992）。蛋白质 1a 大的互作区域表明一种高度有序的结构参与了互作，O'Reilly 等（1995）利用限制性蛋白酶水解和酵母双杂交系统证明了这一点。限制性蛋白酶解还从 CCMV 和 AMV 的 1a 蛋白中鉴定出了一个具有高级结构的解旋酶结构域。酵母双杂交系统进一步显示了在 1a 和 2a 内部以及它们之间互作的特征。这两种蛋白质之间的直接作用的建立依赖于 2a 中心保守的 RdRp 结构域的存在（O'Reilly *et al.*，1997）。蛋白质 1a 分子内的加帽和解旋酶功能域之间的相互作用以及分子间的互作都与其 N 端 515 个残基相关（O'Reilly *et al.*，1997；1998）。由此得出 BMV 复制酶复合体的模型（图 8.8）（O'Reilly *et al.*，1998）；一般认为此模型适用于雀麦花叶病毒科的其他成员。

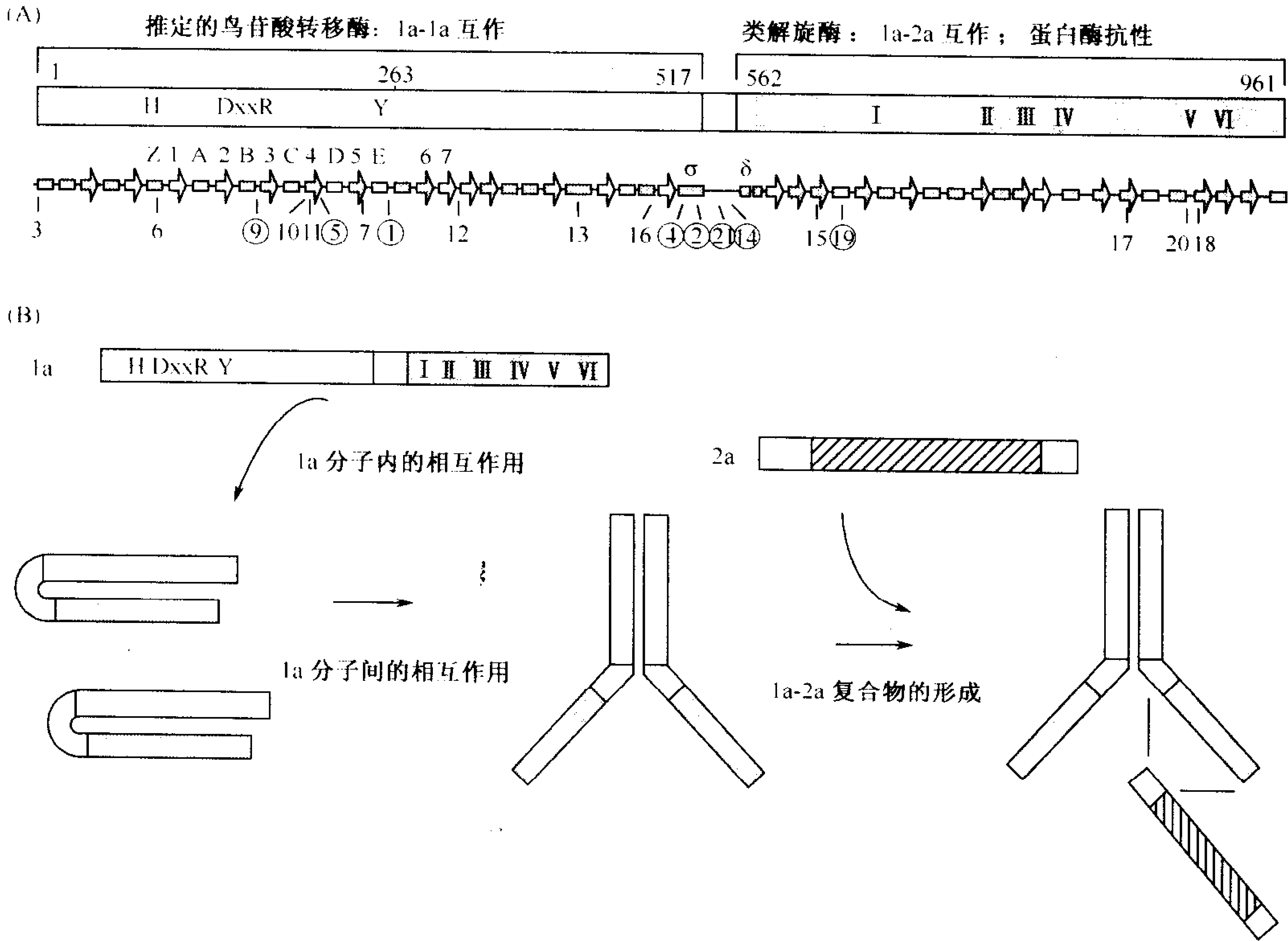


图8.8 （A）BMV 1a 蛋白质以及预测的二级结构示意图。涉及加帽和解旋酶功能的序列被标出。1a-1a 互作所需的推定的帽子结构域被画上浅阴影，而1a-2a 相互作用所需的抗蛋白酶的类解旋酶结构域用暗色阴影标出。预测的二级结构如下所示：框，α 螺旋；箭头，β 折叠。实心部分>80%准确度，空心标注部分>50%准确度。对应于 DNA 甲基转移酶的二级结构根据 Schluckebeier 等(1995)的系统编号。多个突变体的位置通过在有复制能力部分画圈编号表示。(B) 1a 2a 复合体装配的工作模型。推定的1a 分子内交互作用会阻止1a-2a 复合体形成，直到分子间的1a-1a 间相互作用发生为止。2a 蛋白通过它的 N 端与1a 蛋白的类解旋酶结构域相互作用。经允许，引自 O'Reilly 等(1998)。

BMV RNA 1a 的解旋酶和加帽酶活性部位的突变会导致模板募集、负链 RNA 合成以及病毒 RNA 加帽作用的缺陷（Ahola *et al.*，2000）。解旋酶突变体彻底破坏了复制酶系统的所有功能。有两组加帽结构域突变体被确定，一种提高模板结合，但是只允许低水平的负链和 sgRNA 合成；另一种则导致模板结合缺陷，因而导致负链合成仅维持在更低的水平。导致未加帽的 mRNA 降解的酵母染色体外切核酸酶基因的缺失会抑制第二组加帽突变体，但不会抑制第一组加帽突变体。这指出了病毒加帽功能的重要性。在解旋酶和加帽作用酶突变体之间不存在互补作用。

复制复合体还包括 BMV RNA。Quadt 等（1995）指出，BMV RdRp 活性只能从表达 1a 和 2a 蛋白质同时也表达相应的 RNA 3 序列的酵母中提取。对于 BMV RNA 的 3′非翻译区和顺反子间隔区的最低要求表明其在复制复合体的装配、活性或稳定性必需的非模板作用。复制复合体含有 RNA 3，可提高 1a 蛋白质诱导的 RNA 的体内稳定性（Janda and Ahlquist，1998），而且涉及一个 150～190 nt 的基因间区片段，其极可能是作为 RNA 3 复制的一个增强子（Sullivan and Ahlquist，1999）。

3. 体外测定

与用原生质体和酵母细胞系统进行体内研究一样，很多知识是通过利用被侵染的细胞分离复制复合体进行体外研究分析获得的。复制复合体的分离得益于一种基于去污剂——十二烷基-β-D-麦芽糖苷（dodecyl-β-D-maltoside）纯化方法的建立（Bujarski *et al.*，1982）而且微球菌核酸酶的利用使得复合体的分离依赖于模板（Miller and Hall，1983）。然而，如第Ⅲ节 B 所提到的，可溶性复制复合体的分离可导致与之相关联的膜的去除，因而通常会妨碍其完整功能的发挥。

在植物或者酵母体内装配的复制复合体的分离和 RNA 模板的去除使得人们可以对随后加入的 RNA 模板来进行研究。这种实验已证明了 BMV 系统的模板专一性（Hardy *et al.*，1979）以及负链合成可以在附加的正链模板上起始（Miller and Hall，1983；Quadt *et al.*，1995；Sun and Kao，1996）。由此看来，复制复合体在复制了一个模板后，可以再被用于另一条模板，这可能说明顺式作用序列不仅参与了复制酶装配和启动子识别，而且与负链合成的起始相关。

尽管存在上述限制，通过体外系统仍然获得了很多信息。实质上这些信号均是顺式作用的并且位于 5′ 和 3′非翻译区（UTR）及 RNA 3 的顺反子间区（ICR）内（Sullivan and Ahlquist，1997），即负链、正链和 sgRNA 合成起始的位点。大多数关于 BMV 的信息同样适用于其他雀麦花叶病毒属和黄瓜花叶病毒属成员。

新 RNA 链的合成存在几个阶段，其中起始、延伸和释放这 3 个阶段是最显而易见的。在每一个阶段内都可能存在各种不同的事件。

a. 3′非翻译区

BMV（和雀麦花叶病毒属其他病毒）的 3′ UTR 具有复杂的结构，类似 tRNA 结构且形成假结（参见第 4 章第Ⅲ节 A. 3. b）。BMV RNA 的 3′端 134 nt 含一个类tRNA序列，已被确认是体外负链合成所必需的最短序列（Miller *et al.*，1986）。

体外复制起始是不依赖引物的，在 3′-CCA 的倒数第二个 C 残基处起始。这表明末端的 A 残基不是从模板上合成的，而是在复制后由 tRNA 核苷酸转移酶（nucleotidyl

transferase）加在正链上的（Rao *et al.*，1989）。该类 tRNA 序列含有复制酶结合位点（Chapman and Kao，1999），与复制酶互作的特异性由类 tRNA 区域内的一个茎-环结构所确定的（Rao and Hall，1993；Chapman and Kao，1999；Sivakumaran *et al.*，2000）。

Sun 和 Kao（1997a）研究了负链合成的起始和延伸之间的转换后指出，含 10 个或 10 个以上核苷酸的新生 RNA 保持着与复制复合体的结合，并且可以延伸成全长 RNA，但更短的 RNA 则从复制复合体被释放出来。在进一步分析中，利用不含模板的复合体对肝素（heparin）的敏感性，Sun 和 Kao 确定了 3 个步骤中 RNA 合成复合体稳定性的两次转换（图 8.9）。他们指出，复制蛋白质首先结合到 3′端类 tRNA 结构，新生 RNA 合成后，复合体经历一次转换形成更稳定的结构。当短的新生 RNA 链长度达 8～14 nt 时发生第二次转换。

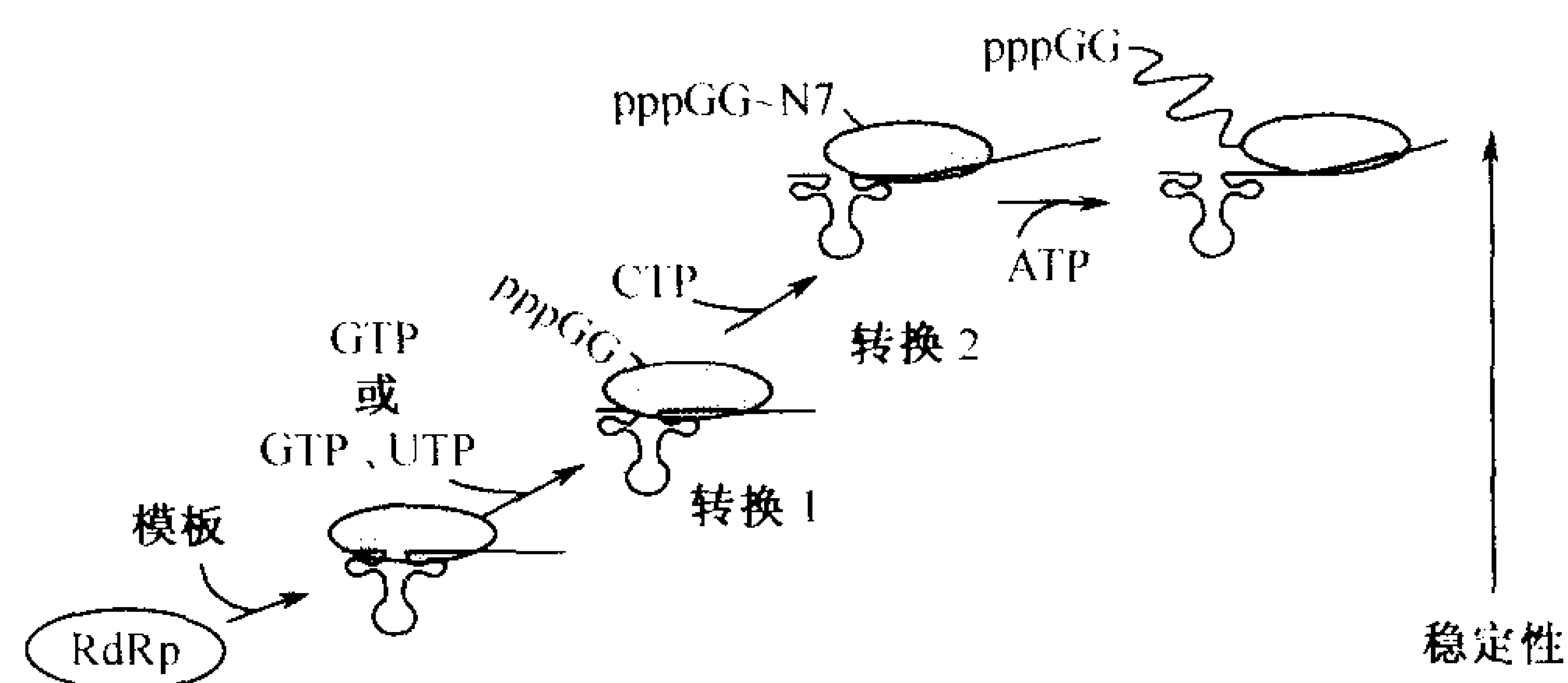


图8.9 RdRp 催化的 BMV RNA 合成从起始到延伸的转换的模型。RNA 合成复合体的稳定性在3个步骤中通过两次转换得到提高。首先，RdRp（椭圆形）结合到病毒 RNA 的 tRNA 结构（绘为三叶草形），组成 RdRp-RNA 二组分复合体。在新生 RNA 合成后，此二组分复合体经历一次结构转换，与模板 RNA 的结合变得更紧密了，具有二级稳定水平。当更多的结合 CTP 产生长度为8～14 nt的短的新生 RNA 时，发生最后一次转换。此时，二组分复合体忠于它所结合的模板，并且可抵抗肝素和其他模板 RNA 的挑战。经允许，引自 Sun 和 Kao（1997b）。

b. 5′非翻译区

雀麦花叶病毒属和黄瓜花叶病毒属 RNA 的 5′UTR 序列具有相似性，最显著的区域与 RNA 聚合酶Ⅲ启动子的识别序列 B 盒（box B）互补，因而也与 tRNA 中保守的 TΨC 环互补（Marsh and Hall，1987）；RNA 3 的顺反子间区也存在同样的 B 盒共有序列。这说明此序列可能参与和寄主因子间的相互作用（Sullivan and Ahlquist，1996）。

如上所述，BMV 复制复合体能从一条正链模板起始负链 RNA 的合成，但是，关于正链合成起始涉及的序列和结构元件则知之甚少。Sivakumaran 和 Kao（1999）指出，正链合成的起始需要在负链模板的 3′端附加一个非模板核苷酸。突变分析显示该非模板核苷酸，连同＋1 和＋2 核苷酸（胞嘧啶核苷酸和腺苷酸）一起，对与复制酶复合体的相互作用有重要意义。此外，基因组的正链 RNA 合成受起始位点 5′上游序列的

影响。该模板识别受负链 RNA 3′端的序列而不是其二级结构的控制（Sivakumaran *et al.*，1999）。

c. 顺反子间区

雀麦花叶病毒属病毒的 RNA 3 编码两种蛋白质，下游的蛋白质由 sgRNA 表达（参见第 6 章第Ⅷ节 A.1）。除了上文所述的 B 盒共有序列外，RNA 3 在顺反子间区内还有一段寡聚腺苷酸序列。

4. 细胞内的分布

利用免疫放射印迹方法，Lastra 和 Schlegel（1975）在接种后 1 天的蚕豆叶片细胞核和细胞质中检测到了 BBMV 抗原。与核结合的抗原数量或多或少基本保持恒量，而数量极大的抗原积累在细胞质中。没有抗原与叶绿体或线粒体结合。在 CCMV 侵染的细胞中，已经发现了极可能是病毒质的无定形膜状内含体和丝状内含体（Kim，1977）。

由 BMV（和 CCMV）引起的超微结构变化包括部分内质网的增殖和修饰。此外，核膜表现为引起含有核酸的小细胞质液泡形成（Burgess *et al.*，1974）。

如上所述，BMV 的复制酶活性与膜结构有关。Restrepo-Hartwig 和 Ahlquist（1996；1999）使用双标记免疫荧光和共聚焦显微镜方法，研究 BMV 侵染的大麦原生质体和酵母细胞，发现整个侵染过程中 1a 和 1b 蛋白质共同定位于一些特定的接近或者围绕细胞核的细胞质位点上，并且 BMV 特异的 RNA 合成也发生于这些位点。BMV 复制复合物与内质网的标记紧密相连，而不与内侧的高尔基体或后期的细胞分泌途径的区室相联系。在酵母细胞中，当缺少蛋白质 2a 时，蛋白质 1a 定位于内质网上（Restrepo-Hartwig and Ahlquist，1998）。由于 1a 和 2a 蛋白质相结合，使 2a 蛋白质不断地聚集在内质网上，因而，1a 被认为是复制复合体的一个关键组织者（Chen and Ahlquist，2000）。

5. 和复制复合体结合的寄主蛋白质

已经发现多种寄主蛋白质和 BMV 复制复合物结合。在研究 BMV 侵染的大麦的复制复合体的特性时，Quadt（1993）等发现了一个寄主蛋白质，其抗原性和麦胚真核翻译起始因子 3（eIF-3）相关。麦胚 eIF-3 的 p41 亚基特异而紧密地与 BMV 蛋白质 2a 结合，加入这个寄主蛋白质还在体外复制系统中促进负链的合成。研究 BMV 复制的酵母系统的建立，已导致鉴定了更多表现出和病毒复制相关的寄主蛋白。在酵母突变体的 3 个互补组研究中，mab1-1（可维持 BMV 的功能）、mab2-1 和 mab3-1 都为单位点的隐性突变，可抑制正链和负链 RNA 3 以及 sgRNA 的积累（Ishikawa *et al.*，1997 b）。一项类似研究表明 BMV 复制需要 Lsm1p。Lsm1p 是一个细胞质内的、与核心 RNA 剪切因子相关的酵母蛋白质（Diez *et al.*，2000）。Lsm1p 互作涉及 BMV 1a 蛋白质和一个病毒内部元件，如在正常的没有多聚腺苷酰化的 BMV RNA 3′端加入 poly（A）会抑制这种作用。因此，Lsm1p 参与了 BMV 复制的一个特殊步骤，可能是通过与结合 mRNA 5′端的因子互作实现的。

F. 黄瓜花叶病毒的复制

黄瓜花叶病毒属病毒有许多特征和雀麦花叶病毒属病毒一样，尽管对它们研究得还不详细。除了 3 个基因组 RNA 以及外壳蛋白的亚基因组 RNA 略长些之外，黄瓜花叶病毒属病毒基因组结构与雀麦花叶病毒属的非常相似。基因组表达 4 个蛋白质产物。复制酶活性由 RNA 1 和 RNA 2 编码（Nitta *et al.*，1988）。上文中所述的 BMV 蛋白质 1a-1a 间通过 N 端甲基转移酶结构域相互作用（参见第Ⅳ节 E2），这在 CMV 中同样被证明了（O′Reilly *et al.*，1997；1998）。Gal-On 等（2000）利用组氨酸标记 1a 和 2a 蛋白质末端的 CMV cDNA 克隆进行研究表明，这些蛋白质和一个膜组分相结合。用这些修饰过的克隆侵染植物的提取物经过 Ni^{2+}-NTA 树脂洗脱，提取了一个依赖模板的 RdRp。然而，只有很小比例的病毒 RdRp 可以结合到这种柱子上。

Sivakumaran 等（2000）利用从 CMV Fny 分离物侵染的烟草中获得的富含复制酶的组分，鉴定出一个与复制酶相互作用的 3′茎-环结构。此结构类似于前文所描述的 BMV 负链的合成起始位点。

CMV 的许多分离物支持卫星 RNA 的复制（参见第 14 章第Ⅱ节 B. 2），这表明在卫星 RNA 上一定存在病毒复制复合体的识别序列。

1. 体外复制

Hayes 和 Buck（1990）从 CMV 侵染的烟草植物中分离出了有功能的聚合酶复合体，对于真核生物的病毒而言这是第一次。被侵染植物的榨取物通过差速离心获得了与膜结合的聚合酶，经过非离子型去污剂处理表明酶活性是可溶的。该聚合酶依赖于 CMV RNA，可以合成负链和正链。虽然它合成正链居多，但是正链并不像在体内发现的是负链的 2 倍那样的比例。复制复合体包括了 CMV 蛋白质 1a、2a 和一个 50 kDa 寄主蛋白质。50 kDa 寄主蛋白质在纯化过程中的丢失会破坏复制酶的活性。

当用正链做模板而不是用负链时，此复制复合体可完全复制 334 nt 的卫星 RNA（Hayes *et al.*，1992）。

2. 复制的位点

CMV RNA 的合成位点可能是与液泡膜相关的具膜的小泡（Hatta and Francki，1981 b）。

G. 苜蓿花叶病毒的复制（Bol，1999）

AMV 基因组分为 3 条 RNA。然而，如同 Bol 等（1971）最初指出的，除非病毒的外壳蛋白存在或者编码外壳蛋白的 sgRNA 4 存在，否则这 3 种 RNA 接种后并不具有侵染性。外壳蛋白也是等轴不稳环斑病毒属病毒侵染起始所必需的，用 TSV 外壳蛋白可激活 AMV 基因组，与 AMV 外壳蛋白功能相同，反之亦然（van Vloten-Doting，1975）。

1. 外壳蛋白-RNA 的相互作用

外壳蛋白对基因组激活作用的主要特征是：

（1）外壳蛋白或外壳蛋白 mRNA，还有 3 个基因组 RNA，都是侵染起始所必需的。

（2）AMV 侵染从一些外壳蛋白分别和 3 个基因组 RNA 结合开始（Smit *et al.*，1981）。

（3）外壳蛋白对病毒的 RNA 具有高亲和力。游离的病毒 RNA 加入到病毒溶液中，会使外壳蛋白亚基从核蛋白中被剥离（van Vloten-Doting and Jaspars，1972）。

（4）AMV 外壳蛋白和相关等轴不稳环斑病毒的外壳蛋白，与 RNA 的结合以及基因组激活作用具有特异性（van Vloten-Doting，1975）。AMV 蛋白质不会与不相关的病毒 RNA 专一性地结合（Zuidema and Jaspars，1985）。

（5）用 AMV RNA 1、2 和 3 或 TSV RNA 1、2 和 3 接种表达 AMV 外壳蛋白的转基因烟草后病毒可以复制。表达 TSV 外壳蛋白的转基因植物也可支持 AMV 3 条 RNA 的复制（van Dun *et al.*，1988 b）。

（6）外壳蛋白专一性结合位点位于 RNA 1～RNA 3 的 3′端附近的位置（Smit *et al.*，1981）。3 条基因组 RNA 在 3′端拥有一个同源序列。

（7）RNA 结合任意 1～3 个外壳蛋白二聚体。在所有的基因组 RNA 上也发现了内部的外壳蛋白结合位点，但是这些位点似乎不具备和蛋白质的强亲合力（Jaspars，1985）。

（8）去除外壳蛋白的 N 端氨基酸会破坏其和 RNA 的有效结合并丧失使基因组 RNA 具有侵染性的能力（Zuidema *et al.*，1983）。

（9）已确定的 AMV RNA-外壳蛋白的相互作用的大多数特征同样适用于等轴不稳环斑病毒属的病毒。

已经利用多种技术阐明了 AMV 外壳蛋白和它的 RNA 之间相互作用的许多细节。用 RNase T1 消化 AMV RNA 1～RNA 4 的 3′端 RNA 片段的结果表明，外壳蛋白会保护一个 36 nt 的片段而不是一个 28 nt 的片段（Jaspars，1985）。RNA 1～RNA 3（因 RNA 4 和 RNA 3 是共有 3′端，故具有相同的结构）的 3′端的二级结构模型（图 8.10）揭示了相似的结构：最多 5 个茎-环结构均由四核苷酸 AUGC 框所连接（van Rossum *et al.*，1997a）。

利用野生型和突变 cDNA 转录产物以及合成的脱氧核苷酸进行条带位移分析，鉴定了 4 个 RNA-外壳蛋白复合体，涉及 AMV RNA 的 3′UTR 的 5 个区域（从 RNA 的 3′端计数，核苷酸 9～18、29～41、63～72、107～121 和 133～144）。其中 3 个复合体涉及 1～86 位核苷酸，一个复合体涉及 85～175 位核苷酸（Bol，1999）。利用突变实验已经证明，AUGC 框，尤其框 2，在外壳蛋白结合作用中的重要性；在发夹 C 和 D 之间的 UUGC 序列也在外壳蛋白结合作用中发挥作用（Reusken and Bol，1996）。这些突变和结合试验研究表明，存在两个独立的结合位点，位点Ⅰ包括 AUGC 框 1、2 和 3；位点Ⅱ包括 AUGC 框 4 和 5（Bol，1999）。提出了发夹结构将 AUGC 框和 UUGC 序列排列成一前一后两个供外壳蛋白二聚体结合的位点（Reusken and Bol，1996）。已

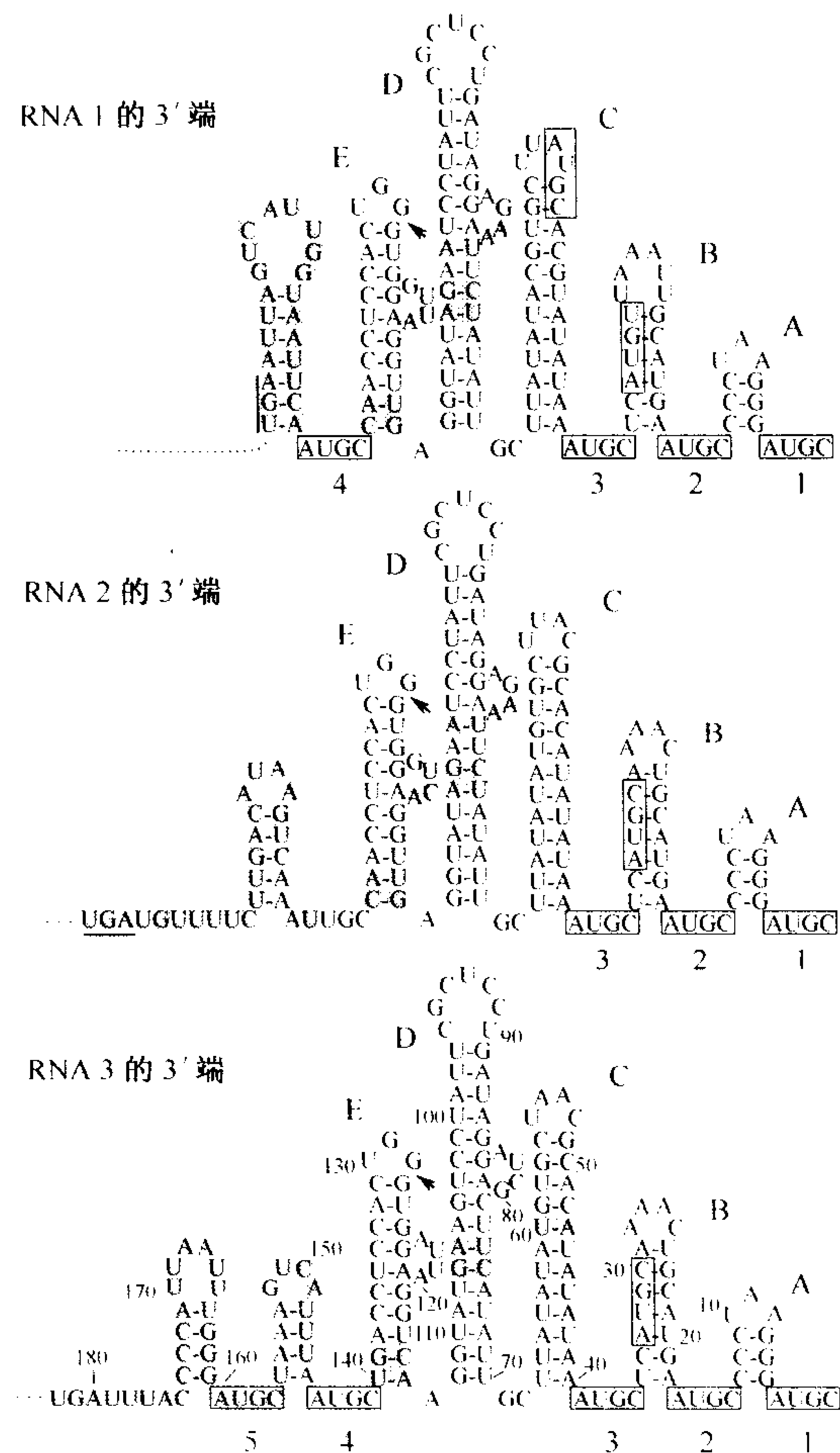


图8.10 AMV 基因组 RNA 的3′UTR 推定的二级结构示意图。这3条 RNA 中不同的碱基用阴影标出，P1、P2和 CP 的终止密码子用黑粗线标出。AUGC 序列模体以长方框标出，箭头指出了病毒 cDNA 上唯一的 *Dra*Ⅲ酶切位点。RNA 3的核苷酸从3′端开始计数。经允许，引自 van Rossum 等(1997a)。

有人提出 AMV 和等轴不稳环斑病毒属病毒的 3′ UTR 存在一假结结构（Olsthoorn *et al.*，1999）。此假结结构与雀麦花叶病毒属、黄瓜花叶病毒属和大麦病毒属病毒 RNA 3′端类 tRNA 结构相似，已经检测到 AMV 3′ UTR 和酵母 CCA 附加酶之间存在一个微弱但特异的交互作用。

如上所述，外壳蛋白以二聚体的形式结合。结合通过 N 端进行，因为当 N 端 40 个氨基酸被去除后，结合作用不会发生（Baer *et al.*，1994）。人工合成的、与 38 个和 25 个氨基酸（分别为 CP38 和 CP25）相对应的肽及一个对应于氨基酸 13～26 的肽通过结合试验表明可以保护 39 nt 的片段免受 RNA 酶 T2 的消化（Ansel-McKinney *et al.*，1996）。CP25 包含 7 个碱性残基，替换实验表明第 17 位的精氨酸（从 N 端计数，起始的甲硫氨酸除外）是关键氨基酸（Ansel-McKinney *et al.*，1996；Yusibov and Loesch-

Fries，1998）。Ansel-McKinney 和 Gehrke（1998）用核苷酸替换、羟基足迹法、乙基化作用和化学修饰干扰分析探究在 RNA 3′端的 39 nt 发生的潜在磷酸及碱基专一性结合。他们确认是 AUGC 框而不是发夹环与之相关，并且鉴定了两个接触位点（图 8.11）。并提出这两个位点就是外壳蛋白二聚体 N 端的结合位点，并且 AUGC 框 2 的 G 碱基可能与外壳蛋白的第 17 位的精氨酸以氢键结合。然而，外壳蛋白不必形成二聚体形式就能进行结合（Tenllado and Bol，2000）（图 8.11）。

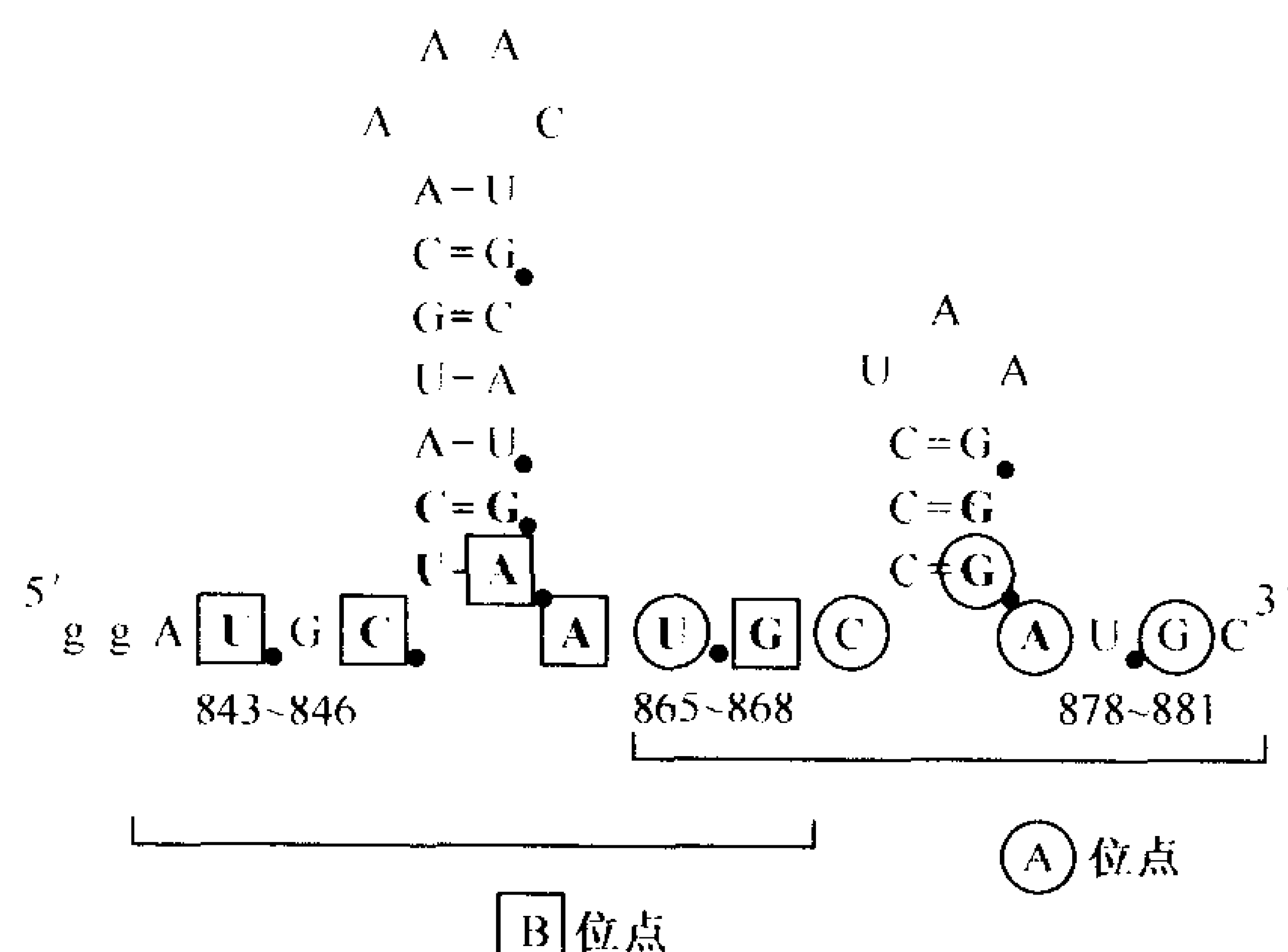


图8.11 AMV$_{843\sim881}$多肽互作模型。画圈和加框的碱基分别表示与推定的结合位点 A 和 B 的碱基专一性接触点。实心圈表示潜在的被乙基化干扰所鉴定的磷酸接触点；粗体字母代表干扰 CP26结合的碱基修饰。经允许，引自 Ansel-Mckinney 和 Gehrke(1998)。

RNA 蛋白印迹（North-Western blot）和点印迹分析表明，等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）PNRSV 的外壳蛋白即使在非常高的盐浓度条件下，也可与病毒的 RNA 4 结合（Pallas *et al.*，1999）。

2. AMV 的复制

已经从 AMV 正在增殖的植株中分离出 RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 相应的 3 种双链复制型 RNA（Pinck and Hirth，1972；Mohier *et al.*，1974）。只有将有侵染性的组分混合后才能产生可检测到的复制型 RNA。Mohier 等（1974）没有发现 RNA 4 相应的复制型。

寄主因子可能参与病毒 RNA 合成，因为在原生质体被接种后的初期，加入放线菌素 D 可以充分地抑制负链和正链的合成（Nassuth *et al.*，1983b）。在原生质体中 RNA 合成的时程（time course）如图 8.12 所示。

已经被确认的 AMV 复制的大多数基本特征与上文所述的 BMV 的相应特征类似。主要的不同表现在基因组 RNA 3′端的结构，以及基因组激活作用需要外壳蛋白的结合。如上所述，近期的发现显示 AMV RNA 的三级结构与雀麦花叶病毒属病毒的相似。无论体内体外，假结结构都是 AMV 复制必要的（Olsthoorn *et al.*，1999）。5 个 AUGC 模体的点突变对 RNA 3 的体外负链合成模板活性无影响（van Rossum *et al.*，1997b），

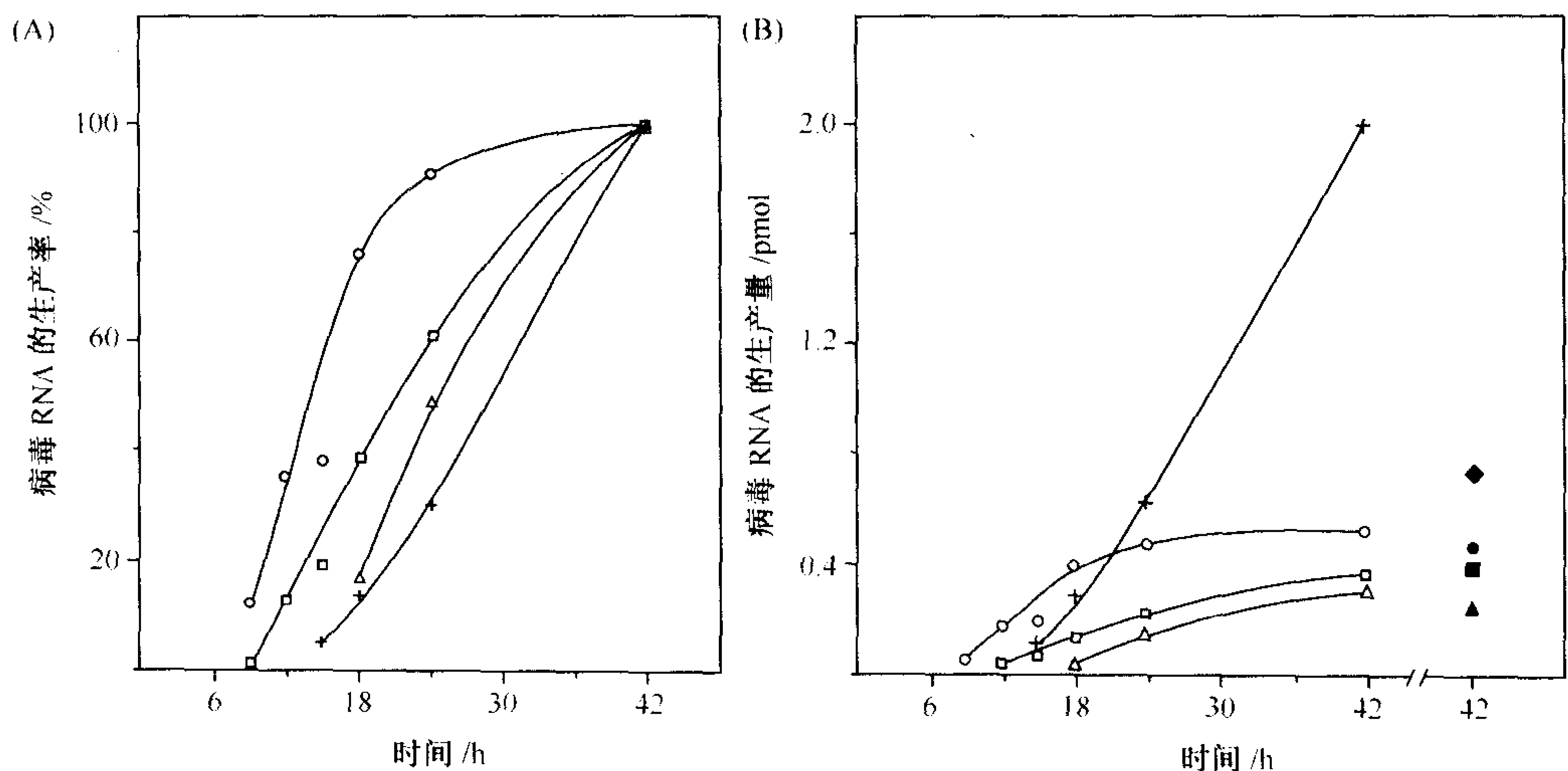


图8.12 正链 AMV RNA 在侵染的豇豆原生质体中合成的时程。(A)病毒 RNA 的相对增长量，在接种后42 h存在的每种 RNA 达到的量看作100%。(B)病毒 RNA 皮摩尔的增量。RNA 1 (□)、RNA 2 (△)、RNA 3(○)和 RNA 4 (+)。(B)图右侧的实心标记指出了在接种原生质体42 h后，RNA 1 (■)、RNA 2 (▲)、RNA 3 (●) 和 RNA4 (◆)存在于病毒粒子中的数量。经允许，引自 Nassuth 等(1983a)。

但是如上所述，可以影响外壳蛋白结合。外壳蛋白与 AMV RNA 3′端的结合干扰假结的形成，从而制约负链 RNA 产生。一般认为，外壳蛋白的结合具有两个作用：①在病毒复制早期阶段中可能与翻译有关；②在后期侵染过程中参与关闭负链 RNA 的合成(Olsthoorn *et al.*，1999)。

Neeleman 和 Bol (1999) 利用非转基因烟草和由带有 P1 和 P2 基因的 RNA 1 与 RNA 2 的 cDNA 克隆转化植物的原生质体研究表明，转基因的 P1 不能与 RNA 1 中影响 P1 基因的突变互补，这说明 P1 在 RNA 1 的复制中是顺式作用的。从非转基因植物中 RNA 3 突变体的行为可得出结论，RNA 1 和 RNA 2 的复制以及壳体化需要外壳蛋白反式作用，而 RNA 3 的复制和壳体化则需要外壳蛋白顺式作用。用 RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 侵染用 P1 和 P2 共同转化的植物体获得的原生质体，结果表明 RNA 1 和 RNA 2 复制的起始需要接种体中存在外壳蛋白，而 RNA 3 则不需要。这表明，由 RNA 3 表达的外壳蛋白不能替代接种体中存在的外壳蛋白的功能。因此，接种体中的外壳蛋白是病毒负链合成必需的，而在起始侵染之后，从 RNA 3 表达的外壳蛋白是正链合成所必需的。

RNA 4 不能对异源 RNA 子代的遗传特性产生影响 (Bol and van Vloten-Doting，1973)。用仅包含 RNA 1、RNA 2 和 RNA 4 的病毒粒子接种原生质体，在 RNA 产物中没有发现 RNA 4 (Nassuth *et al.*，1981)。van der Kuyl 等 (1990) 利用一种来自侵染植物中的病毒专一性 RdRp 制备了 AMV RNA 3 cDNA 的 RNA 转录物。通过缺失分析表明，一个位于 RNA 4 合成起始位点上游－8 和－55 的序列对于外壳蛋白亚基因组 RNA 体外合成是足够的。因此，像 BMV 一样，AMV RNA 4 的合成似乎是在负链 RNA 3 上一个内部的复制酶识别位点起始的 (Nassuth *et al.*，1983a)。

3. 病毒合成和装配的位点

复制复合体被发现存在细胞质组分中。外壳蛋白在接种 6 h 后在细胞质内出现，并且在 48 h 后出现在核中（van Pelt-Heerschap *et al.*，1987a）。在被 AMV 侵染细胞的细胞质中可观察到成堆的 AMV 粒子（De Zoeten and Gaard，1969a；Hull *et al.*，1970），有时在核中也可见（Hull *et al.*，1970）。虽然证据不是十分确定，但所有的 AMV 组分都可能是在细胞质中合成和装配。

de Graaff 等（1993）在从 AMV 侵染的烟草原生质体中分离复制复合体时发现，大部分的 RNA 合成活性在蔗糖梯度中共同定位于完整的叶绿体上。RNA 聚合活性对用蛋白酶处理叶绿体敏感，说明酶活性和叶绿体外表面有较强的联系。

4. 体外复制

从被 AMV 侵染的本生烟植物中获得了一个可溶性复制复合体（Quadt *et al.*，1991）。此复合体具有 AMV 模板专一性，并且利用 AMV 天然的 dsRNA 表明，它还具有解旋酶活性。此复合体由 AMV RNA 1 和 RNA 2 编码的蛋白质 P1、P2 和外壳蛋白组成，但是负链的合成受到 AMV 外壳蛋白抑制。

H. 烟草花叶病毒的复制（Buck，1999）

1. 被侵染植物中的 RNA

在侵染的植物和原生质体中，发现了没有被包装的 TMV 负链和正链 RNA 以 RF 和 RI 两种形式存在。在原生质体中，负链的合成在接种后 6～8 h 终止，而正链的合成可再持续进行 10 h（Ishikawa *et al.*，1991a）。一般认为，在稍后的侵染周期中，大部分正链开始包装进病毒粒子之内（Aoki and Takebe，1975；Palukaitis *et al.*，1983）。

2. 复制蛋白

TMV 的 5′ ORF 编码一个 126 kDa 蛋白质，它的终止密码子发生通读可以产生一个 183 kDa 蛋白质（参见第 6 章第Ⅷ节 H.1）；因此，两个蛋白质具有相同的 N 端序列，183 kDa 蛋白质具备一个独有的 C 端序列。一系列相关证据指出这两个蛋白质都参与了病毒 RNA 的复制，包括下列证据：

（1）两个蛋白质都有甲基转移酶和解旋酶模体，并且 183 kDa 蛋白质还包含 RdRp 模体。

（2）发现两个蛋白质都存在于从被侵染的植物中分离的复制复合体中（Osman and Buck，1996；Watanabe *et al.*，1999）。在这些复合物中，126 kDa 和 183 kDa 蛋白质的比例是 1∶1（Watanabe *et al.*，1999）。

（3）对应于 126 kDa 和 183 kDa 蛋白质的抗体可以抑制体外系统的复制（Osman and Buck，1996）。

（4）只产生 126 kDa 蛋白质而不产 183 kDa 蛋白质的突变体不能复制（Ishikawa *et al.*，1986）。

（5）将琥珀型终止密码子 UAG 突变成酪胺酸密码子 UAU 的突变体只能产生 183 kDa蛋白质，在原生质体中可以复制，但是其水平只有野生型的 20%。在植物中，此突变回复成赭石终止密码子 UAA，之后病毒可以更有效地复制（Ishikawa *et al.*，1986）。

（6）126 kDa 蛋白质的解旋酶结构域与 183 kDa 蛋白质的间插区域互作（Goregaoker *et al.*，2001）。

为了检验 126 kDa 和 183 kDa 蛋白质的功能，Lewandowski 和 Dawson（2000）建立了一个双分体（bipartite）系统，从两个独立的 RNA 上表达这两种蛋白质。183 kDa 的蛋白质具备所有从它的模体推断出来的功能：识别负链与正链合成的启动子、转录 sgRNA、为 RNA 加帽并且复制缺损 RNA；该蛋白质式其 mRNA 还能在植物中进行细胞间移动。加入 126 kDa 蛋白质后，病毒 RNA 复制的速度有近 10 倍的提高；126 kDa 蛋白质的功能主要以顺式方式发挥作用。因此，高效的复制需要 183 kDa 蛋白质和 126 kDa蛋白质形成一个可能和 RNA 结合的异源二聚体。当然，126 kDa 蛋白质可能还具有其他功能。如第 7 章第Ⅴ节 B. 9. c 中所述，126 kDa 蛋白质的产量大概是通读产物 183 kDa 蛋白质的 10 倍，而两个蛋白质 以 1∶1 的比例形成异源二聚体。那么，剩下的 90%的 126 kDa 蛋白质的功能是什么?

3. TMV RNA 上的顺式作用因子

TMV RNA 的 3′ UTR 可折叠成 3 个结构域：一个位于 3′类似 tRNA 受体臂的结构域；一个类似 tRNA 反密码子臂的结构域；一个上游的由 3 个假结组成的结构域，每个假结包含两个双螺旋片段（Van Belkum *et al.*，1985；Felden *et al.*，1996）。突变分析表明其中一个双螺旋片段是复制必需的，具有二级结构比一级结构更重要的特征（Takamatsu *et al.*，1990a）。

大多数 TMV 株系的类 tRNA 结构可被寄主的组氨酸-tRNA 合成酶氨基酰化，但是豇豆毒株（即现在的 SHMV）和 TYMV 相似，被缬氨酸氨基酰化。TMV- L 的 3′ UTR 用 TMV-OM、CGMMV 或 SHMV 的 3′ UTR 置换后，嵌合体可以在原生质体和植物中复制，尽管后两者的复制水平比 TMV- L 低（Ishikawa *et al.*，1988）。当 TMV- L的 3′UTR 被 BMV 的 3′UTR（酪氨酸受体）替换时，嵌合体能复制，但是相比 TMV- L 而言效率非常低（Ishikawa *et al.*，1991 b）。这表明 TMV 聚合酶对它的识别位点有一定适应性，这与 BMV 形成对比，BMV RNA 3 的 3′UTR 被 TMV- L 的 3′ UTR 替换后，BMV 聚合酶不能识别（Ishikawa *et al.*，1991 b）。

TMV RNA 的 5′端序列对复制是很重要的（Takamatsu *et al.*，1991）。5′区域的大段缺失以及第 2～8 位核苷酸的缺失会破坏复制，而 5′UTR 的其他小缺失则不会。这说明 5′复制酶结合位点可能是复杂的。

TMV 基因组的内部序列已经被确认可反式作用抑制复制（Lewandowski and Dawson，1998a）。3420～4902 核苷酸之间区域的缺失（编码 183 kDa 蛋白质的 RdRp 结构域的序列）产生一个复制缺陷型 RNA（dRNA），可在 TMV 反式作用下被复制。

卫星（STMV）的复制需要辅助病毒，说明它具有必要的反式作用序列。STMV 将在第 14 章第Ⅱ节 A. 4 中进行描述。虽然 STMV 和各种亚基因组复制子反式利用

TMV 复制酶，而基因组 RNA 的负链合成更倾向于顺式交互作用（Lewandowski and Dawson，1998 b）。

4. 体外分析

体外 RNA 合成最初只是或多或少在被侵染的细胞的成分中检测到。一病毒专一性 RdRp 和膜组分相结合（Zaitlin *et al.*，1973；Romaine and Zaitlin，1978）。其可以催化正链或负链两者的合成。

Young 和 Zaitlin（1986）使用正或负链 DNA 探针，通过来自 TMV 侵染的烟草叶片 30 000 *g* 沉淀的粗组分，分析了体外合成的 RNA 的结构。被放射性核苷酸标记的主要产物具有预期的 TMV RF 和 RI 的特征（图 8.6）。在 RF 中，与正链结合的标记物多于和负链的结合。在 RI 组分中只检测到正链标记。该系统受很多限制：合成活性是短暂的；系统对增加的模板 RNA 无反应；如果有，也仅仅是形成非常少的游离的子代病毒 RNA 分子。这些结果与 Watanabe 和 Okada 报道的非常类似（1986）。他们用了一个 2500 *g* 沉淀物，结果显示外壳蛋白 sgRNA 可以由这个组分合成。他们检测到了基因组大小的 RF，但是没有检测到外壳蛋白亚基因组大小的 RF。此外，他们也没有发现此大小的负链 RNA 合成，这说明亚基因组外壳蛋 RNA 的合成，与其说是转录自亚基因组负链，不如说是由基因组负链上内部起始的。

Osman 和 Buck（1996）从 ToMV 侵染的番茄叶片分离了一个膜结合的复制复合体。此复制复合体依赖模板，有模板专一性，不依赖于引物，并且能以含有 3′端序列的正链 RNA 为模板起始 RNA 的合成。以同源的模板反应的主要产物是基因组长度的 ssRNA，伴有一些 dsRNA。126 kDa 和 183 kDa 蛋白质都存在于复制复合体中，并且这些蛋白质的抗体会抑制这种模板专一性复制。

Watanabe 等（1999）从 TMV（OM 株系）侵染的烟草植株中免疫纯化了一个可溶性复制复合体，并表明它由一个由 126 kDa 和 183 kDa 蛋白质构成的异质二聚体。此复合体能以 TMV RNA 3′端的 249 个核苷酸构成的正链为模板合成负链。

5. 参与复制复合体的寄主蛋白

关于寄主蛋白质参与 TMV 复制，最早引起注意的是病毒增殖的早期阶段对放线菌素 D 敏感（Dawson and Schlegel，1976；Dawson，1978）。然而，由于接种的是病毒粒子，因此存在一种可能性，那就是放线菌素 D 处理影响的可能是病毒脱壳阶段。在两个互相无关的单一隐性拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）突变体 *tom-1* 和 *tom-2* 中，TMV 复制被减弱到非常低的水平（Ishikawa *et al.*，1993；Ohshima *et al.*，1998）；这些突变不影响 CMV 、TCV 或 TYMV 的复制。*Tm-1* 抗性基因的产物，为番茄提供 TMV 抗性（参见第 10 章第Ⅲ节 A），已经被提出是参与病毒 RNA 复制的寄主蛋白质的一个变型（Meshi *et al.*，1988）。抗性突变的株系是在 126/183 kDa 蛋白质的解旋酶附近发生突变，这些区域可能就是与推定的寄主蛋白质结合的区域。然而，另有观点认为，Tm-1 蛋白质可能和病毒复制酶互相作用而致使它钝化，或者 Tm-1 植株中寄主对非抗性突变 TMV 株系的反应可能导致对病毒复制的非病毒特异性抑制（Buck，1999）。

一个高度纯化的 TMV 复制复合体除包含 126 kDa 和 183 kDa 蛋白质外，还有 3 个分别为 56 kDa、54 kDa 和 50 kDa 的寄主蛋白质（Osman and Buck，1997）。该 56 kDa 蛋白质与来自酵母和麦芽（56 kDa）翻译起始因子 eIF3 的 55 kDa 亚基（GCD10）免疫相关。Taylor 和 Carr（2000）利用酵母双杂交系统显示，酵母 GCD10 特异地与 TMV 126 kDa 和 183 kDa 蛋白质共有的甲基转移酶结构域相互作用。TMV 复制复合体与类 GCD10 蛋白质的结合表明，在体内，复制和蛋白质合成可能是紧密相连的。Watanabe 等（1999）在纯化的复制复合体中发现了两种推定的 34 kDa 和 220 kDa 寄主蛋白质；在纯化复制复合体时所使用的免疫球蛋白的重链与 55 kDa 的 GCD10 蛋白质的移动位置接近。

拟南芥基因 *tom-1* 是 TMV-Cg 和 TMV-L 在单一细胞水平有效增殖所必需的，但与 CMV、TYMV 或 TCV 的增殖无关（Ishikawa *et al.*，1991c；1993）。基于图谱的克隆分析表明，Tom 1 蛋白质具有多途径跨膜蛋白质的结构（Yamanaka *et al.*，2000）。Tom-1 与 126（130）/183 kDa 复制酶蛋白质的解旋酶结构域互相作用，这说明它在体内作为膜锚定元件参与复制复合体的形成。

6. 复制的位点

TMV 在细胞内复制的位点与细胞质内含体或病毒质相关，被称为“X 体”，由富含核糖体基质内的聚集细管组成（Hill *et al.*，1987；Saito *et al.*，1987 b）（图 8.4）。早期的细胞学研究表明这些与核有关（Bald，1964；Smith and Schlegel，1965），但随后研究显示 RI 和 RdRp 与细胞质膜结合（Beachy and Zaitlin，1975；Osman and Buck，1996）。利用绿色荧光蛋白（GFP）（参见第 9 章第Ⅱ节 B. e）作为 TMV 表达报道基因，在细胞中鉴定了包含有病毒复制酶（和运动蛋白质）的不规则形状结构；这些结构起源于内质网（Heinlein *et al.*，1998；Reichel and Beachy，1998）。Más 和 Beachy（1999）利用原位杂交和免疫染色结果表明，TMV RNA、病毒复制酶和病毒运动蛋白质共同定位于内质网，包括核周内质网及和内质网相关的小泡。这将在第 13 章中进一步讨论。

I. 马铃薯 Y 病毒属病毒的复制

马铃薯 Y 病毒属（*Potyvirus*）基因组以多聚蛋白的形式表达，多聚蛋白被加工成 10 个产物（参见第 7 章节Ⅴ节 B. 1）。尽管大部分蛋白质产物均可以某种形式参与病毒复制，但存在一组核心复制蛋白，即 CI 解旋酶、6K2、NIa VPg 蛋白酶和 NIb RdRp。正如基因组结构图所示（参见第 6 章第Ⅷ节 C. 1），这些复制蛋白质形成一个蛋白质模块。这些蛋白质在其编码基因顺序和序列模体方面分别和马铃薯 Y 病毒属病毒的 2C、3A、3B、3C 和 3D 蛋白质类似（Domier *et al.*，1987）。因此，它们很可能在复制策略和功能上存在相似性。下面将根据它们在多聚蛋白中占据的位置考虑这些蛋白质的特性，然后再把它们之间的相互作用的信息整合起来。

马铃薯 Y 病毒属病毒的 CI 蛋白质具有推定的解旋酶的氨基酸模体（参见第Ⅳ节 B. 2），并已经在 TamMV 和 PPV 上证明具有 RNA 结合活性和 NTPase、解旋酶活性（Eagles *et al.*，1994；Fernández *et al.*，1995）。解旋酶 7 个特征保守氨基酸模体中的

一个突变（模体 V），破坏了 *E. coli* 表达的 PPV CI 蛋白质中的解旋酶活性，也影响 NTP 水解，但不影响 RNA 结合（Fernández *et al.*，1997）。这些突变体会影响侵染性克隆在原生质体内的复制能力，以及影响对整株植物体的侵染，除非恢复成野生型才能消除。

TEV 6K2 蛋白质是膜结合蛋白（Restrepo-Hartwig and Carrington，1994），并且突变分析证明它参与病毒复制。与膜的结合是由一个包括 19 个氨基酸的中心疏水区域介导的（图 8.13）（Schaad *et al.*，1997）。

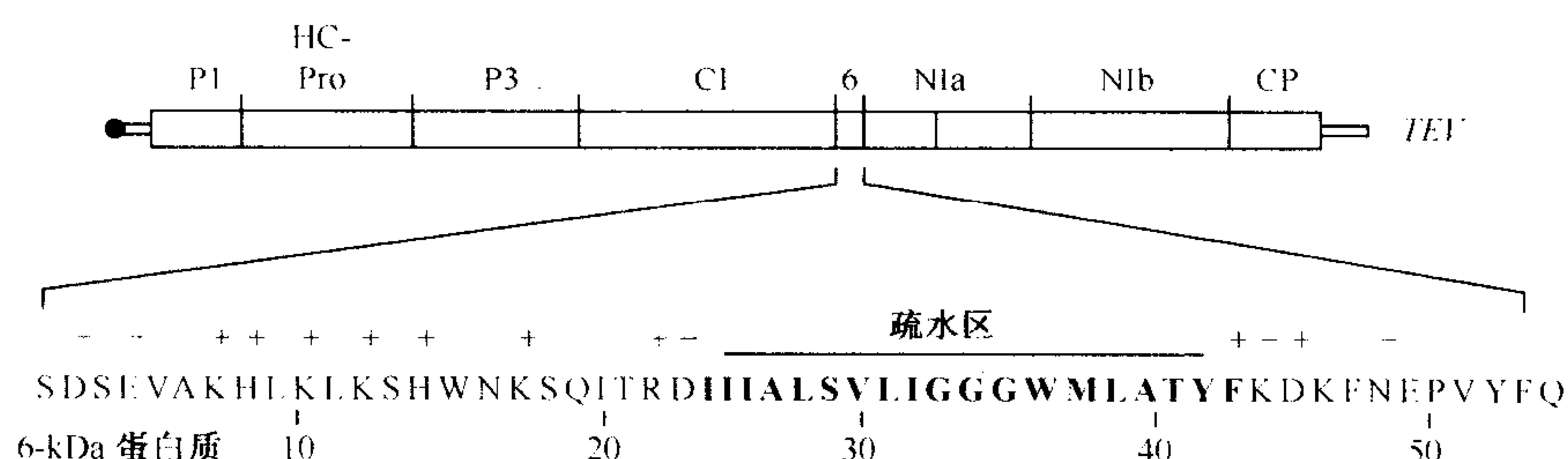


图8.13 TEV 基因组和 6 kDa 蛋白质氨基酸序列示意图。此图是按比例绘制的，在示意图上方标出了每个编码区域。垂直线标出了序列编码的蛋白酶切割位点。5′端的 VPg 用实心圈表示。6 kDa 蛋白质序列的中央疏水区用黑体字母表示，并且标明了带电荷的残基。承蒙版权所有者（Oxford University Press）惠允，引自 Schaad 等（1997）。

Schaad 等（1997）利用包含 6 kDa 蛋白质的荧光融合蛋白质研究指出，6 kDa 蛋白质和来源于内质网（ER）的大的泡状结构结合。TEV 的侵染开始后，ER 看似被瓦解成不连续的聚集结构，复制复合物中的病毒 RNA 与类 ER 的膜结合。PPV RNA 的复制也已被证明和粗的膜成分相关（Martin and Garcia，1991）。

NIa 加工后产物包含两个区域：N 端 VPg 和 C 端蛋白酶；VPg 的特性已经分别在第 4 章（第Ⅲ节 A. 3. c）和第 7 章（第Ⅴ节 B. 1. b）中描述。*E. coli* 中表达的 PVA VPg 和 NIa 都和 TEV NIa 的蛋白酶结构域（Daròs and Carrington，1997）一样与 RNA 结合（Merits *et al.*，1998）。

NIb 蛋白质具有一个 RdRp 的氨基酸序列模体，在 *E. coli* 中表达的 PVA 的此蛋白质已被证明和核酸结合（Merits *et al.*，1998）。针对 GDD 模体的突变、核定位信号突变以及使 NIb N 端切割位点衰弱的突变均会破坏 TEV 的侵染性克隆在原生质体中的复制能力，其作用等同于完全去除该基因（Li and Carrington，1995）。这些突变体，除了影响 N 端切割以外，可通过 NIb 转基因表达得到不同程度的补足。

多方面的研究已经揭示出这些马铃薯 Y 病毒的复制相关蛋白质之间的一系列的互作。Li 等（1997）利用酵母双杂交系统发现了 TEV 的 NIb 与 NIa 的互作，这种互作发生在两者蛋白酶结构域之间，而不是 Vpg 结构域。通过结合研究也发现 TVMV 的 NIb 和 NIa 之间有一个类似的互作，但是在此例中，VPg 区域也参与互作（Hong *et al.*，1995；Fellers *et al.*，1998）。对于这种差异，它所反映的是马铃薯 Y 病毒属病毒之间的差异还是不同技术手段的差异，目前还不确定。NIa 和 VPg 蛋白质（来自 TVMV）激发了 NIb-相关的 RNA 聚合酶活性，这种激发主要归功于 VPg（Fellers *et al.*，

1998)。Darós 等（1999）利用条件性和抑制突变体证明，NIa 和 NIb 之间的互作对于 TEV 基因组复制是必需的。

PVA 多聚蛋白第一个（N 端）和第三个蛋白质（P1 和 P3）彼此互作，并且与 CI、VPg、NIa 和 NIb 互作（Merits *et al.*，1999）。这些互作的意义还不清楚。通过酵母双杂交系统，Wittmann 等（1997）发现 TuMV 的 VPg 与来自拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的真核翻译起始因子（iso）4E 互作的。

至此，可获得马铃薯 Y 病毒复制复合体的成分和装配的全景图。这涉及基因产物之间的互作以及多聚蛋白加工的调控。在 TEV 侵染的细胞中，检测到了 3 个包含 6 kDa蛋白质的多聚蛋白，CI/6 K、6 K/VPg 和 6 K/NIa（VPg 加上蛋白酶）（Restrepo-Hartwig and Carrington，1994）。一般认为，复制复合体在 ER 样膜上装配，最初通过 6 kDa 蛋白质在膜上结合而起始。借助 6 kDa 蛋白质的膜结合活性克服 NIa 的核定位信号也引入 NIa 蛋白（Restrepo-Hartwig and Carrington，1992）。NIa 通过它结合 RNA 的能力将病毒 RNA 引入复制复合体。之后 6 K-NIa 复合体通过 NIa-NIb 交互作用聚集 NIb 产物，将聚合酶运送给 RNA。对马铃薯 Y 病毒多聚蛋白调控加工使复合体的元件得以组装，并且在它们完成功能后释放。因此，聚集了 NIb 的 NIa 被从复合体释放出来，它的核定位能力将它定位至细胞核内。

一般认为，VPg 以一种类似于在小 RNA 病毒中提到过的方式参与 RNA 合成的起始（Wimmer *et al.*，1993；Pfister *et al.*，1999）。寄主蛋白质和其他马铃薯 Y 病毒的蛋白质很可能也募集到复合体内。

J. 豇豆花叶病毒科病毒的复制

1. 豇豆花叶病毒属病毒

如第 6 章（第Ⅷ节 B. 1）所述，CPMV 拥有双组分基因组，每部分分别编码多聚蛋白，可切割成功能蛋白质。RNA 1 编码的蛋白质对复制而言是足够的，而且这些蛋白质的结构和序列模体表现出与动物小核糖核酸病毒很强的相似性（Frannssen *et al.*，1984b）。在这一点上，豇豆花叶病毒属病毒与马铃薯 Y 属病毒类似，而且很可能它们有很多共同的复制特征。然而，与马铃薯 Y 属病毒的复制相比，对豇豆花叶病毒属病毒的了解要少一些，并且几乎可以肯定它们在细节上存在差异。

2. CPMV 复制的一般特征

在被接种的豇豆原生质体中，接种 9～24 h 后，具有侵染力的病毒快速增殖，每个原生质体有超过 10^6 个子代病毒产生（Hibi *et al.*，1975）。从被侵染的豇豆中已经鉴定出与病毒的单链基因组 RNA 相对应的两个 dsRNA（van Griensven *et al.*，1973）。

为了研究 CPMV 中的顺式和反式作用元件，van Bokhoven 等（1993a）在保留 5′ UTR 和 3′ UTR 不变的情况下，将异源序列引入 RNA 1 的 ORF 中的不同位点。所有突变体 RNA 都不能够复制，附加野生型 RNA 1 并不能互补突变体 RNA 的复制。这说明 RNA 1 复制一定是顺式的，并且不能在反式条件被复制。由于复制蛋白质是由 RNA 1编码的，因而 RNA 2 的复制一定是反式的。然而，RNA 2 的突变表明，在复制

中对58 kDa蛋白质 N 端结构域的需求是顺式的。一般认为 58 kDa 蛋白质的 N 端结构域的作用是将 RNA 2 定位于复制复合体。

在豇豆原生质体中，基于 35S 启动子的 RNA 1 表达载体瞬时表达能够支持 RNA 2 的复制（Van Bokhoven *et al.*，1993b）。然而，只有当 200 kDa 多聚蛋白完全表达的时候才能支持复制，使用包含 170 kDa、110 kDa 或 87 kDa 编码序列的载体都不可以。

Owens 和 Bruening（1975）用核糖磷酸激酶的多肽作内部对照，使用放线酮和氯霉素进行实验得出结论，在 CPMV 中发现的外壳蛋白质都是在细胞质中合成的。已经在细胞质和液泡中观察到呈晶体排列的子代病毒颗粒，但是在核、叶绿体或线粒体里面则观察不到（Langenberg and Schroeder，1975）。侵染 CPMV 的细胞产生了相当大的细胞质病理性结构（图 8.14）。

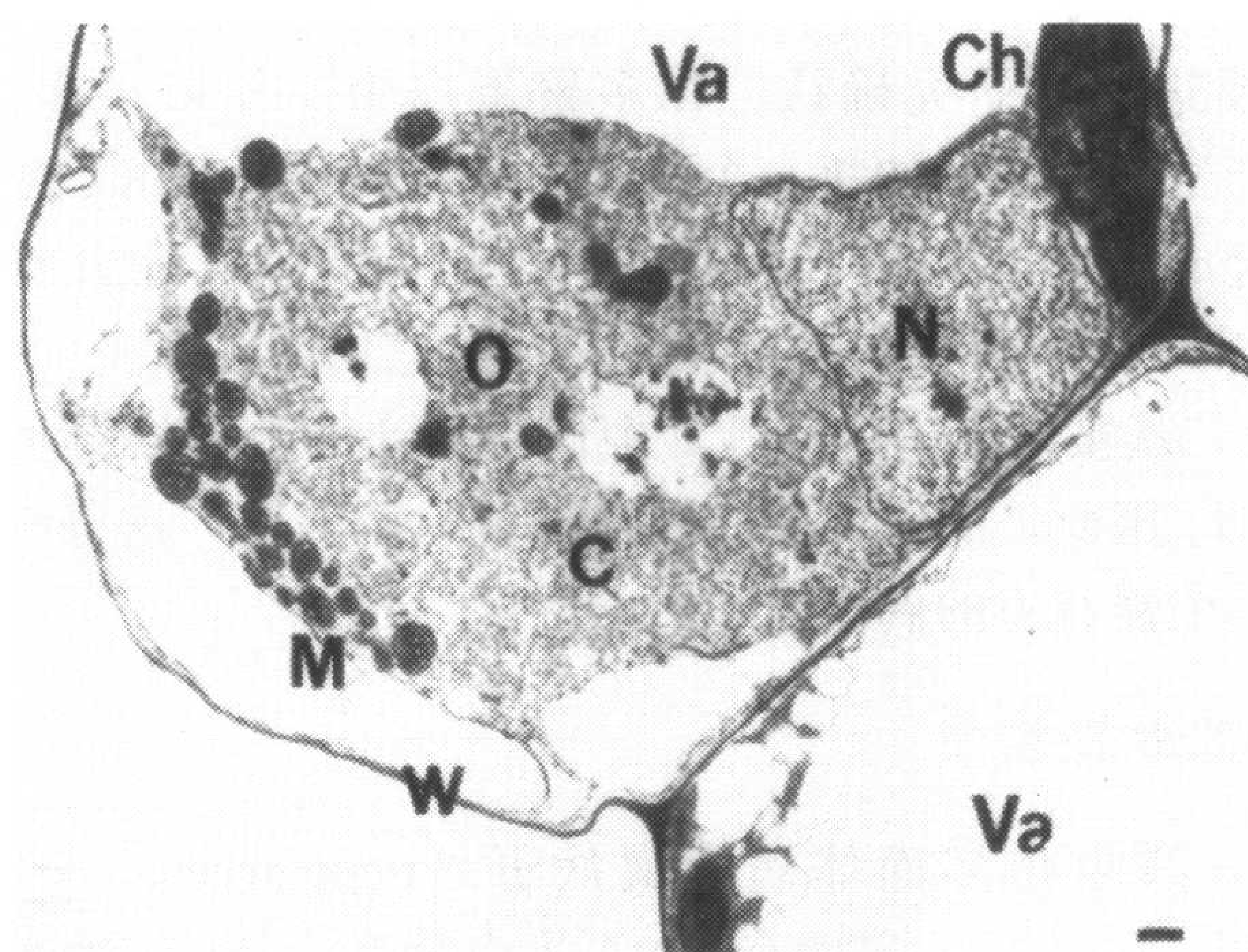


图8.14　CPMV 合成的细胞内位点。被 CPMV 侵染的叶肉细胞的电子显微照片。注意与细胞质病理性结构(C)相关的线粒体(M)和核(N)；大的液泡(Va)；细胞壁(W)和叶绿体(Ch)。比例尺＝0.5 μm。经允许，引自 De Zoeten 等(1974)。

成组的膜状小泡形成一个网状体（reticulum）。小泡中包含双链核酸染色显形的物质，也存在病毒粒子。De Zoeten 等（1974）通过一项结合了电子显微镜和细胞分级分离程序的详细研究得出结论，病毒 dsRNA 定位于这些被认为是病毒质的结构中。在被侵染的豇豆和烟草原生质体中也观察到了这些病毒质（Hibi *et al.*，1975）。小泡来源于皮层内质网的一个特殊区域的大量增生，但不涉及高尔基器（Carette *et al.*，2000）。CPMV 的复制被浅蓝菌素强烈抑制，浅蓝菌素是脂质起始合成的一个抑制剂，这说明膜的增殖涉及脂质的合成。这与 AMV 和 TMV 正相反（Carette *et al.*，2000）。

绿色荧光蛋白标签的应用，使我们能跟踪膜结构的形成阶段（Carette *et al.*，2000）。在较早的阶段中，在外层 ER 有一些荧光小体。随后聚集成一个大的荧光体，通常位于核的附近。使用杆状病毒表达载体在昆虫细胞中表达 RNA 1 的 200 kDa 的多聚蛋白，也观察到类似结构（van Bokhoven *et al.*，1992）。

CPMV 侵染叶片后，一个寄主编码的 RdRp 活性使病毒增殖 20 倍。在被侵染的原生质体中没有这种增加。此活性和一个 130 kDa 的多肽有关。尽管这个酶在被侵染的叶

片分离的粗膜组分中有活性，但它在 CPMV 的复制中不起作用（Dorssers *et al.*，1983，1984；van der Meer *et al.*，1984）。

3. CPMV 复制复合体

CPMV RNA 复制复合体包含一个由病毒编码的 110 kDa 的多肽，已经从被侵染的豇豆叶片分离到（Dorssers *et al.*，1984）。在复制复合体中还有其他寄主特异性多肽，但是它们在 RNA 复制中的作用还没有确定。如果在接种之后立刻施用放线菌素 D 会抑制 RNA 的合成，但如果稍晚一点施用则不会抑制（de Varennes *et al.*，1985）。这说明有些寄主编码的蛋白质可能是 RNA 复制所必需的。在体外，这个复制复合体能够使初生的病毒 RNA 延伸成全长的 RNA。Van Kammen 和 Eggen（1986）讨论了 RNA 复制可能的模型。病毒 RNA 复制的起始可能与多聚蛋白的加工有联系，而且 VPg 可能发挥作用，但是还需要进一步研究确认。在多聚蛋白中 110 kDa 多肽所处的位置（图 7.28）要求，对于产生的该蛋白的每一个分子，B-RNA 编码的其他多肽如果没有完全被切割也一定需要合成出来。B-RNA 编码的其他蛋白质事实上出现在这些细胞病理学结构中（Wellink *et al.*，1988），但是还没有完成对它们的鉴定。

在 RNA 复制中，从被侵染的豇豆叶片中仅检测到很小部分的非结构蛋白具有活性（Eggen *et al.*，1988）。因此，病毒复制蛋白质可能只用一次，这也许是因为在多聚蛋白加工和复制之间有一个强有力的偶联。

4. 线虫传多面体病毒属病毒

体内研究表明，线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）的 RNA 1 能在缺乏 RNA 2的情况下复制，因此其一定携有 RNA 聚合酶和 VPg 基因。该病毒的复制还没有被详细研究。在黄瓜子叶中，TRSV 诱导的 RNA 聚合活性在接种后大约 3 天快速增长到最大，之后开始降低（Peden *et al.*，1972）。推测 TRSV 经由 RI 型 RNA 复制，但是在被侵染的植物中只分离到了低分子质量的 dsRNA（Rezaian and Francki，1973）。

GFLV RNA 2 的诱变分析表明，蛋白质 2A（类似上文所述的 CPMV 58 kDa 蛋白质）是 RNA 2 复制所必需的；RNA 2 的其他区域也是必要的（Gaire *et al.*，1999）。将 2A 蛋白绿色荧光蛋白（2AGFP）与融合，并在烟草 BY2 原生质体中表达。2AGFP 单独表达时呈小点状均匀的分散在整个细胞质中；当和 GFLV RNA 共同侵染时发现，2AGFP 则定位于 RNA 1 编码的两个复制蛋白质——蛋白酶 1D 和 VPg 1C 上。用 5-溴尿苷（5-bromouridine）5′三磷酸掺入鉴定了新合成的病毒 RNA 也存在于相同的位置。该结果支持了 CPMV RNA 2 多聚蛋白 N 端部分负责将 RNA 2 定位于复制复合体上的说法。

病毒外壳蛋白是在细胞质核糖体上合成的，而且电子显微镜和细胞分级分离实验都显示，TRSV 在细胞质中复制（Rezaian *et al.*，1976）可能与特征性的膜状小泡（membranous vesicle）有联系。

K. 芜菁黄花叶病毒（TYMV）的复制

1. 病毒在原生质体和叶片中的增殖

在被侵染的芸薹原生质中，也许在接种后不到 12 h 就开始有病毒产生。Renaudin 等（1975）发现侵染 48 h 后每个原生质体细胞产生 1×10^6～2×10^6 个病毒粒子，与在叶片细胞中估计的值相当（Matthews，1970）。然而，后者的估计值是建立在被侵染的完整叶片提取物上的，没有考虑诸如大小差异、不同细胞类型中病毒的生产率或者叶片中实际被侵染的细胞的比例等因素。基于每个被侵染的叶肉细胞病毒粒子，原生质体中病毒粒子的数量大概只有天然叶片中类似细胞产生的病毒的 1/10。在原生质体中，空蛋白壳的产生并没有像病毒一样缩减。两种类型的粒子几乎以相同的比例产生，这与叶片中只有约 20%的空壳形成对比。每个被侵染的原生质体中病毒粒子产生的近似最大产率与体内或体外侵染的细胞大致相同。在原生质体中，大约 48 h 后病毒增殖终止，但是在完整的叶片中大约持续 10 天之久。通过叶绿体圆形（rounding）和聚集（clumping）程度的判定，病害在原生质体中的发展并不同步（Sugimura and Matthews，1981）。

2. TYMV 复制与对细胞学影响的关系

芜菁黄花叶病毒属导致被侵染的细胞产生非常典型的细胞学变化。一些和病毒复制密切相关的变化将会在这里讨论。其他的次级细胞学效应已在第 3 章中描述。

芜菁黄花叶病毒侵染最典型的特征是叶绿体上小的外周小泡（图 8.15）。这些小泡包含病毒的 RI 分子和病毒的 RdRp，在所有被侵染的寄主物种都存在，并在被检测植物的所有部位发生（Matthews，1973）。小泡是如何形成的还不确定。一定意义上讲，它们被认为起源于叶绿体膜的内陷，但是先前存在的膜被修饰还是有额外的叶绿体膜合成仍是未知的。

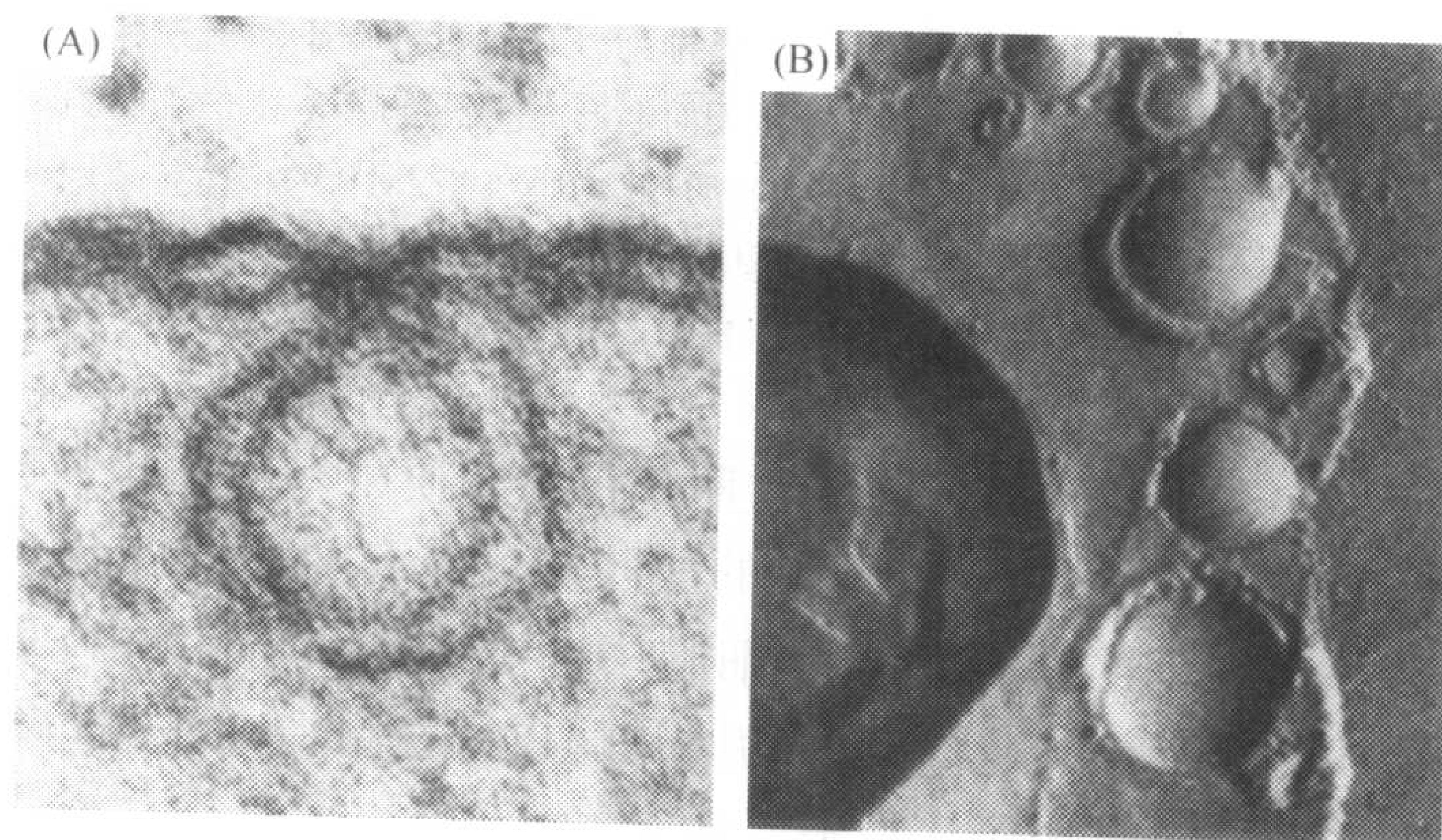


图8.15 被侵染的大白菜细胞叶绿体中 TYMV 诱导的周边小泡(peripheral vesicle)的微细结构。(A)超薄切片显示内部叶绿体和外部小泡膜的连续性，以及小泡内具有双链核酸染色特性的链状物质(×235 000)。经 S. Bullivant 授权 。(B)通过分离的叶绿体冷冻断裂展示的小泡膜精细结构(×92 000)。经允许，引自 Hatta 等(1973)。

利用小泡的出现作为侵染发生的标志，当侵染从小叶脉的韧皮部分子（phloem element）扩展时，可以在细胞学上追踪一个系统性侵染的叶片的入侵过程（Hatta and Matthew，1974）。较重要的阶段在图 8.16 和图 3.6 中展示，并且在图注中给予描述。

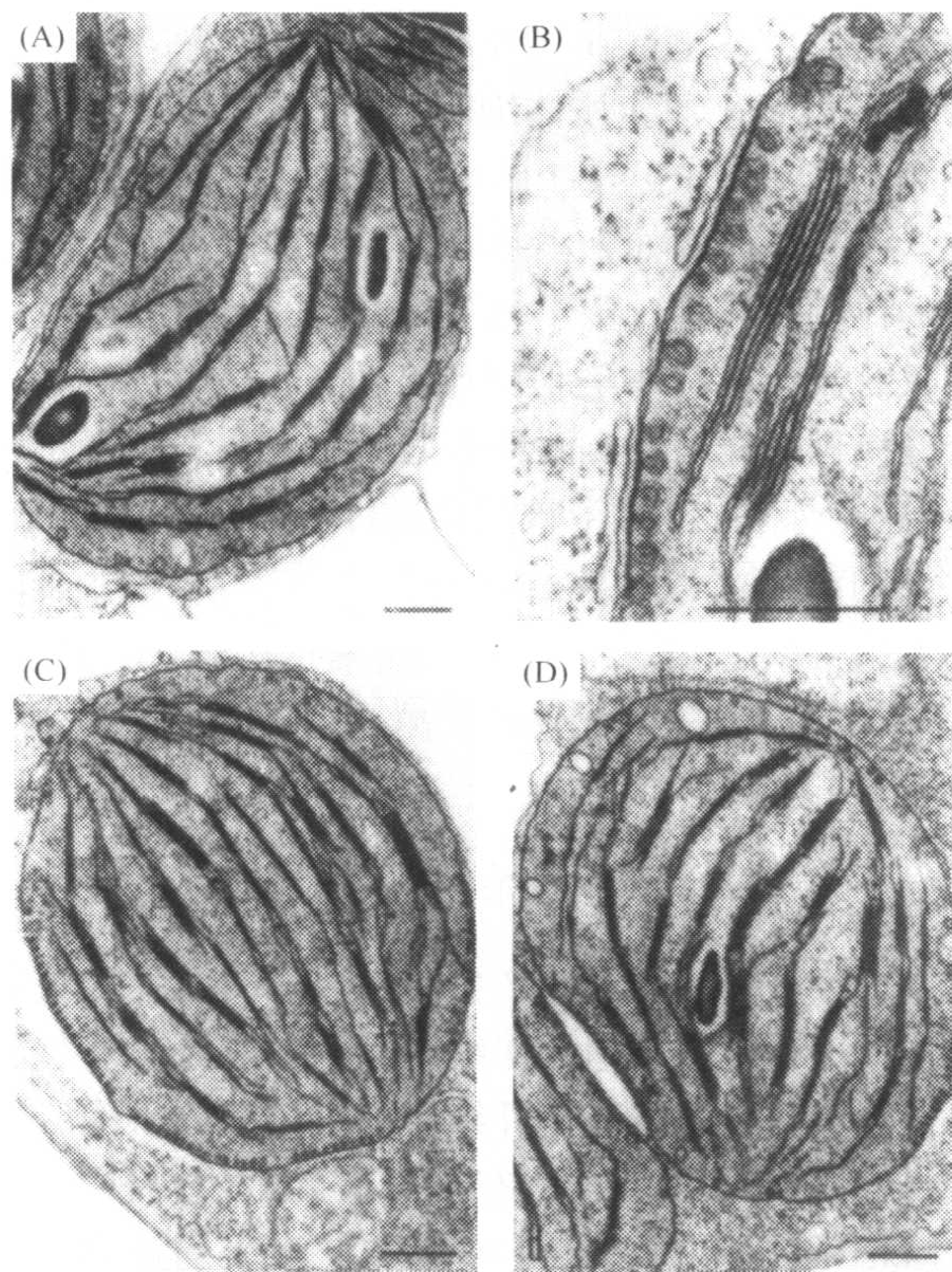


图8.16 TYMV 侵染在白菜叶片细胞中诱导细胞学变化的时序步骤。(A)除了离散的外周小泡，叶绿体其他方面正常。(B)叶绿体是肿胀的，离散的外周小泡仍然存在，但是聚生的小泡也存在。在冷冻断裂制品中，可以看到小泡呈六边形排列。ER 越过外周小泡出现在细胞质中。越过每一簇小泡的 ER 区被 ER 串联着，在叶绿体表面上形成网状(Hatta and Matthews，1976)。(C)电子透明区域在成簇的小泡之外出现在细胞质。此物质与 TYMV 的抗体有反应。冷冻断裂显示，它以五聚体或六聚体形式存在。(D)叶绿体通过带有电子透明区相连接成丛生状。后来，电子透明区材料被病毒粒子替代。经允许，引自 Hatta 和 Matthews(1974)。

可检测 TYMV 粒子的最早时期是在 C 期，在细胞质中呈晶体状紧邻电子透明区排列［图 3.6（A）］。现有结论认为，叶绿体的成团聚集是侵染的一个次级效应，不是病毒合成所必需的。在接下来比 C 期更迟的细胞中，更多更大的病毒粒子陈列出现在细胞质内，而电子透明物质消失。电子透明物质是病毒外壳蛋白的积累，主要或完全以五聚体和六聚体的形式存在，可用于病毒粒子的装配。

在阶段 B（图 8.16）瞬时出现 ER 的作用还没有确定。从它出现的时间以及它在细胞中特异性位置来看，它可能参与下列任一或所有过程：①形成外周小泡所需的一种或多种蛋白质的合成；②病毒的 RNA 聚合酶的合成；③病毒的外壳蛋白的合成。

在 TYMV 和其他芜菁花叶病毒属病毒侵染的细胞中，病毒外壳蛋白在细胞核中以

空蛋白壳的形式大量积累（Hatta and Matthews，1976）。在核中没有鉴定出病毒粒子。在TYMV侵染的白菜细胞中，在细胞质中电子透明区出现之前就能在细胞核中检测到外壳蛋白。外壳蛋白的数量随时间增长，直到细胞核几乎被空的蛋白衣壳充满［图3.6(B)］。推断认为病毒蛋白一定是在细胞质中合成，之后通过核孔或者直接穿过核膜进入细胞核。

3. TYMV 复制复合物

在TYMV侵染白菜的提取物中，RNA聚合酶活性和叶绿体组分结合（Bové *et al.*，1967；Ralph and Wojcik，1966）。该酶已在包含病毒诱导的小泡的叶绿体膜结合组分中被检测到（Laflèche *et al.*，1972；Bové *et al.*，1972）。Mouches等（1984）从被侵染的大白菜叶片中纯化了TYMV复制酶。该酶模板依赖并且表现出对TYMV RNA的专一性。该酶由两个亚基所组成：一个是由病毒编码的115 kDa蛋白质，它和基因组RNA的一个115 kDa的体外翻译产物之间有血清学交叉反应（Candresse *et al.*，1986）；另一个45 kDa蛋白质是寄主编码的，因为与它相对的抗体不与任何TYMV体外翻译产品反应（Bové and Bové，1985）。在体内，病毒的复制酶紧紧地结合在包括叶绿体被膜结构在内的复制复合体中。相反，在健康和被侵染的叶片中发现的寄主编码的RdR是一种大小不同、具有不同模板特异性的可溶性酶（Mouches *et al.*，1984）。

已经从TYMV侵染的大白菜叶片的去污剂可溶解的叶绿体膜中分离了RNA复制活性物（Deiman *et al.*，1997a；Singh and Dreher，1997）。此活性是模板依赖的，虽然它不能从基因组TYMV RNA合成全长负链，但是它可从基于3′端的较短的片段合成负链。如第4章第Ⅲ节B.3.b所述，TYMV RNA的3′端具有类tRNA结构并且形成假结。Deiman等（1997b）以及Singh和Dreher（1997）研究了该类tRNA结构的功用，表明它对负链合成的起始有重要意义。假结结构的破坏会导致转录效率约50%的衰减。在对应3′端CCA的倒数第二个C残基的位置插入GTP，负链会通过重新起始出现（Singh and Dreher，1997）。最小的模板长度是3′端9个核苷酸，并且随着模板长度的增加转录效率会提高（Deiman *et al.*，2000）。这些观察加上3′端发夹结构的突变分析表明，适当的碱基堆积有助于高效率的转录起始。因此，很可能是RNA 3′端结构靶标于3′CCA进行起始，并且避免起始发生在内部的CCA位点。

4. TYMV 的体内复制

Garnier等（1980）利用电子显微镜检查结合其他技术证明，TYMV RI在体内主要以单链形式存在，而且从被侵染的叶片中分离的dsRNA（Bockstahler，1967）主要是分离期间受人为因素影响产生的（图8.6）。不过，在侵染循环的晚期，体内可能会有一些dsRF积累。

大多数病毒的RNA合成发生在病变的叶绿体外周小泡中这一观念（图8.15）被下列进一步的证据支持：①当通过切片观察时，可以看见很多小泡，其中含有被预期用于双链核酸的染色剂附着的物质（图8.15）（Ushiyama and Matthews，1970）；②在被侵染的植物组织的提取物中，TYMV RNA的双链形式与叶绿体组分的结合优于与核或可

溶解组分的结合（Bové *et al.*，1967，Ralph and Wojcik，1966）；③Laflèche 和 Bové（1968）利用 3H 标记的尿嘧啶放射自显影表明，在发病的细胞中，放射性物质聚集在丛生的叶绿体的间距里；④在被侵染的细胞中，免疫金标记定位病毒复制酶于丛生的叶绿体外围附近（Garnier *et al.*，1986）。尽管 TYMV 和叶绿体有紧密联系，但叶绿素的存在对 TYMV 的复制而言并不是必需的。病毒可以在白菜下胚轴黄化的稀叶绿素的原生质体中增殖（Fernandez-Gonzalez *et al.*，1980）。

TYMV 侵染也激发核内核酸的合成。Laflèche 和 Bové（1968）指出，在被放线菌素 D 处理的 TYMV 侵染的细胞中，3H 标记的尿嘧啶积聚在被丛生叶绿体附近，以及细胞核内或核附近。Bedbrook 等（1974）指出，来自 TYMV 侵染的组织的放射性标记核内核苷酸包含健康叶片中相应核酸中没有的两个组分。这些核内事件对 TYMV 复制的意义有待研究。

TYMV RNA 中具有显著高含量的胞嘧啶核苷酸，据此可以很容易的通过体内被 ^{32}P标记的 RNA 的比例清楚地辨别 TYMV RNA 是单链还是双链。观察结果符合这个观点：病毒 RNA 经由不对称半保留加工产生，在此过程中，正链产生比负链的产生更有效率（Ralph *et al.*，1965）。更详细的研究指出，在侵染的极早和极晚阶段，负链的合成占优势（Bedbrook and Matthews，1976）。

在体内，含有外壳蛋白基因的亚基因组 RNA 被 ^{32}P 标记要比基因组 RNA 更快速，推测外壳蛋白 mRNA 较快速地合成（Matthews *et al.*，1963）。但此 mRNA 的合成位置还未确定。

L. 其他正链 RNA 病毒的复制

虽然其他正链 RNA 病毒的复制没有像上述那些病毒进行详细地研究，但仍有与了解病毒侵染循环方面相关的各种各样的推测。其中一些在此节讨论。

1. 大麦病毒属（*Hordeivirus*）

近几年的研究表明，该属典型成员 BSMV 的一些株系包含两个基因组，而其他则包含 3 个基因组。这是因为一些株系中的 RNA 2 和 RNA 3 很难通过凝胶电泳分开。BSMV 两个株系的全长基因组 cDNA 克隆在 5′端帽子结构存在下在体外被转录。3 个 RNA 转录产物的组合可以侵染大麦，说明了基因组的三分体特性（Petty *et al.*，1989）。有关大麦病毒属病毒已经被 Lawrence 和 Jackson 做过综述（1999）。

a. 病毒的体内复制

在用 BSMV 接种的大麦原生质体中，子代病毒大约 12 h 之后被首次检测到，在 48 h增加到每个原生质体约 2×10^6 个病毒颗粒（Ben-Sin and Po，1982）。在病毒缓慢侵染、正在复制的大麦新叶中，很难检测到游离的病毒 RNA。相反地，在急性的系统性侵染期间，积累大量的未包装的 RNA，而且这些 RNA 与一个 60 kDa 蛋白质结合（Brakke *et al.*，1988）。

用免疫金细胞化学技术进行切片后组织染色，Lin 和 Langenberg（1985）将 dsRNA 定位于被侵染的大麦根细胞前质体（proplastid）周围的小泡中。通过追踪在受侵染的根和条（shoot）的分生组织区连续的细胞间侵染，Lin 和 Langenberg（1984a）明确了

一系列的细胞学的事件。最早的事件（阶段1）是根分生组织细胞的前质体周边的小泡的出现。在阶段1晚期检测到病毒蛋白质，而是不病毒粒子。阶段2的标志是杆状病毒粒子被垂直地定向并附着于前质体的膜上。在阶段3中，也可以观察到杆状粒子附着于内质网上。在阶段4病毒的蛋白质（但只有少量的杆状粒子）在核中出现。没有在异染色质中看到病毒蛋白质。

b. 病毒基因和复制

BSMV的三分体基因组包含7个ORF（参见第6章第Ⅷ节H.14）。αa和γa ORF的产物包含必要的BSMV编码复制成分（Petty *et al.*，1990）。为分析3种RNA的复制中的顺式作用因子，Zhou和Jackson（1996）构建了ND18株系的侵染性cDNA克隆的一系列缺失体。这些突变体和野生型α和γ的转录成分混合后接种到原生质体进行下列观察：

（1）复制需要5′和3′非编码区。

（2）RNA α的所有内部缺失阻止复制。

（3）包括每个ORF和poly（A）区域的RNA β的缺失体通过RNA α和RNA γ可以复制，但是积累有一些减少。

（4）γa最初的507 nt的缺失导致ORF不表达。

（5）在γa的中央和3′的区域，或者在γa-γb基因间的区域和在γb的缺失体可以反式方式扩增。

（6）rb蛋白质参与同源性互作形成二聚体、三聚体和更高层次的复合物（Bragg *et al.*，2001）

2. 番茄丛矮病毒属（*Tombusvirus*）

番茄丛矮病毒属病毒的单一RNA成分含有5个主要的基因和一个附加的3′端第6个小可读框（pX）（其基因组组构参见第6章第Ⅷ节D.1）。ORF 2包含RdRp的GDD模体特征，并通过缺乏任何复制酶模（甲基转移酶或解旋酶）体的ORF 1的通读表达。然而，下面一些证据表明核心复制酶是ORF 1和ORF 2的产物：

（1）表达CymRSV的ORF 1和ORF 2转基因植物支持没有自主复制能力的DI RNA的复制（Kollár and Burgyán，1994）。

（2）使用抗p33（ORF 1）和抗p92（ORF 2）的抗血清，Scholthof等（1995）证明这些蛋白质在TBSV侵染早期表达而且与膜结合在一起。p33比p92丰富20倍。在ORF 1尾端的UAG终止密码子被改造为UAC或UAU（二者均编码酪氨酸）的突变体在原生质体中不增殖。

（3）TBSV的p33和p92分开表达，如同上述的TMV一样（参见第Ⅳ节H.2）可支持病毒RNA的复制（Oster *et al.*，1998）。这两种蛋白质对于病毒RNA的复制是必需的，但是如果在它们之间存在互作，也不会是特别严格的互作。p33 C端约6%的氨基酸是功能必需的。

（4）CIRV的p36（ORF 1）在酵母内表达引起了膜增生并改变了线粒体的形态（Rubino *et al.*，2000）

TBSV pX ORF通过缺失或插入产生的突变体在黄瓜或本生烟的原生质体中不能积

累到可检测的水平（Scholthof and Jackson，1997）。然而，一个终止密码子引入 ORF 中央所产生的突变体具有侵染性，表明这种结果是由于 RNA 而并非蛋白质产物所致。复制所要求的 RNA 顺式作用序列是寄主特异的，因为突变体影响病毒在黄瓜或本生烟草内的积累而在昆诺阿黎的原生质体或植株中没有这种影响。

对与番茄丛矮病毒侵染相关 DI RNA 的分析，初步明确了参与复制的病毒 RNA 序列（参见第Ⅸ节 C.2）。

3. 烟草脆裂病毒

TRV 和 TMV 类似，具有一个二分体的基因组（参见第 6 章第Ⅷ节 H.2）。已经利用多种技术获得在烟草叶肉原生质体中 TRV 复制事件的概要（Harrison *et al.*，1976）。在 22～25℃，侵染性 RNA 1 接种后 7 h 被检测到。在这一阶段没有发现其他变化。杆状核蛋白在第 9 h 被电子显微镜、荧光抗体和侵染性检测到。看来没有外壳蛋白的积累，只出现了病毒 RNA 的积累，并在合成后 4～5 h 被包装组成杆状病毒。有侵染性的 RNA 合成主要在 12 h 之内完成，而有侵染性的核蛋白则在 24 h 之内完成。

尽管有一些短杆状粒子在早期出现，它们的合成落后于长杆状粒子，但是在 40 h 之内二者都已经达到较高的稳定水平值。两种杆状粒子的第二个不同之处是二者在细胞中的分布。短杆状粒子主要分散在细胞质中，而长杆状粒子则以一种特殊的方式与线粒体相结合（Harrison and Roberts，1968；Kitajima and Costa，1969）（图 8.17）。

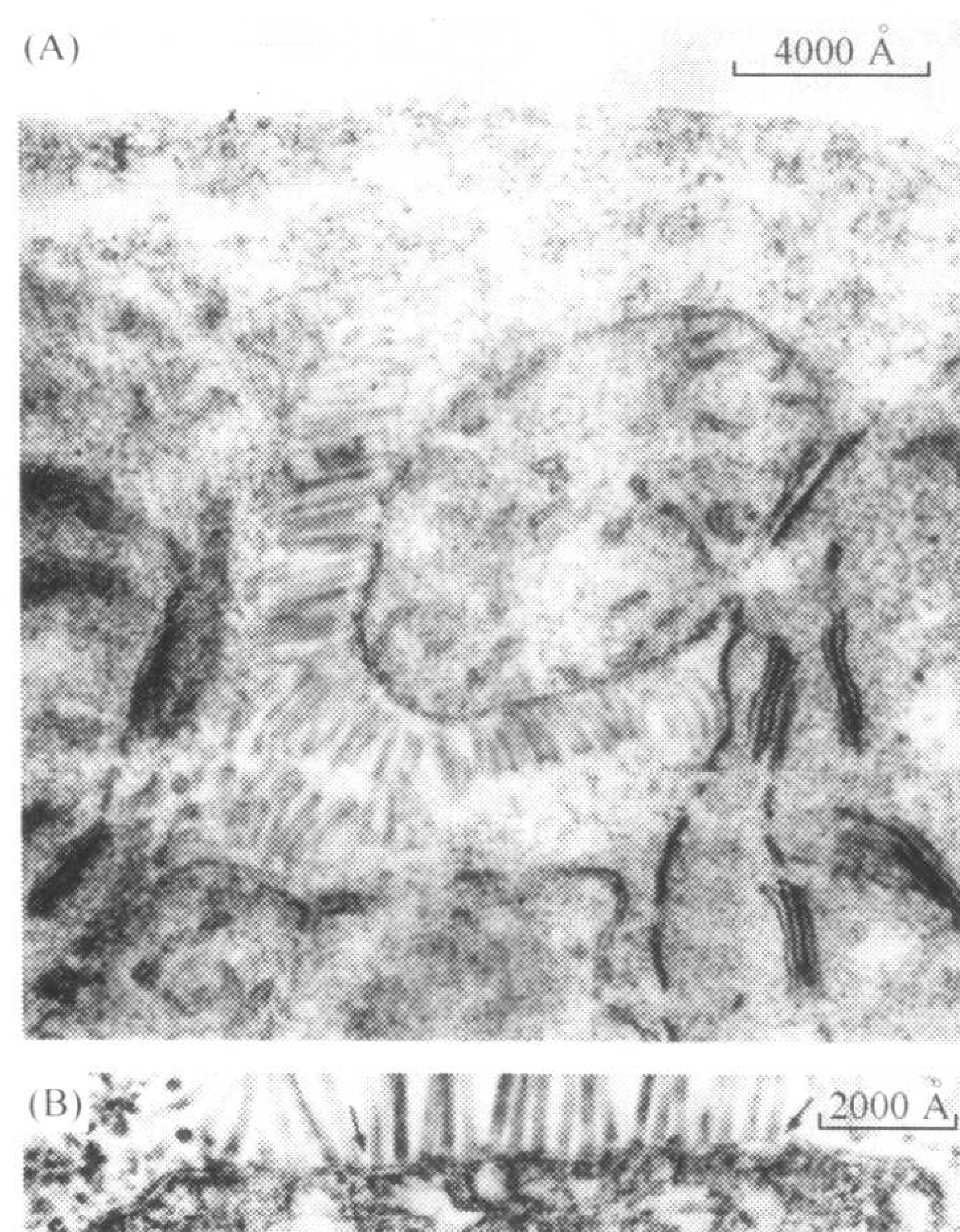


图8.17　TRV 粒子与线粒体的结合。(A)高锰酸钾处理的克利夫兰烟叶片的切片，显示线粒体外存在病毒粒子，第二个线粒体位于底部左侧，部分叶绿体位于左侧和右侧。(B)放大的线粒体膜，显示病毒颗粒紧贴但没有刺穿外膜(箭头)。经允许，引自 Harrison 和 Roberts(1968)。

杆状粒子的末端紧贴在线粒体膜上，但并不穿透它。杆状粒子不与其他的细胞器结合。该病毒的加州株系与普通烟草的线粒体没有明显的结合（De Zoeten，1966）。

4. 豌豆耳突花叶病

豌豆耳突花叶病是由两种病毒（耳突花叶病毒属的 PEMV-1 和幽影病毒属的 PEMV-2）复合引起的（参见第 2 章第Ⅲ节 P. 3）。然而，为研究该病害，两种病毒已被一起考虑。

利用荧光抗体检测表明，在接种的烟草原生质体早期，抗原存在于细胞核和细胞质中，而晚期则主要局限在核内（Motoyoshi and Hull，1974）。在电子显微镜下的研究表明，在原生质体被 PEMV 侵染 17 h 后，首先可见的病症是细胞质的膜束缚体，包括一系列包含微丝的小泡。其中的一些似与核膜融合。病毒仅在核中被观察到（Burgess *et al.*，1974b）。

采用各种不同的技术，De Zoeten 等（1976）确定了 PEMV 的 dsRNA 存在于被侵染细胞的核中。PEMV 诱导的 RNA 聚合酶活性也与核相关联，就像病毒诱导的细胞质内小泡一样（Powell *et al.*，1977）。

Powell 和 De Zoeten（1977）指出，在体外将 PEMV RNA 加入由健康豌豆中分离出的细胞核中，可以支持 PEMV RNA 复制的起始。这可以分别被下列两点证实：①抵抗放线菌素 D 的聚合酶活性持续增加并在温育 10 h 后达到最大值；②杂交实验证明至少一部分聚合酶活性导致了 PEMV 特异性的 RNA 的合成。合成的大多数 RNA 是双链形式中的负链，但也合成一些正链 RNA。这些和病毒的 RNA 而不是完整的 PEMV 粒体发生的启动反应，有力地证明了在完整的细胞中，病毒 RNA 在到达细胞核之前是未被包装的（uncoated）。对一些其他的病毒 RNA 进行了测定，但只有 PEMV 的 RNA 能够在细胞核中促进病毒 RNA 的合成。

在被 PEMV-1 RNA 侵染的豌豆原生质体中，发现了基于核膜的复制复合体（Demler *et al.*，1994）。两种 RNA 上存在的 VPg 都是由 PEMV-1 编码的。VPg 的突变影响了 PEMV-1 RNA 的复制能力，但不影响 PEMV-2 RNA 的复制（Skaf *et al.*，2000）。PEMV-1 和 PEMV-2 均能独立地复制，PEMV-1 还提供包装两种 RNA 的外壳蛋白。看来只有和 VPg 共价结合的 RNA 被包裹，这表明对于 PEMV-2 来讲，VPg 与复制无关而只是提供了一个包裹信号。

有关 PEMV 复制还存在一些未被解答的问题，包括：①是否病毒复合体的两种 RNA 都在核中复制；②复制发生在核膜的内侧还是外侧；③在两种病毒的复制复合体之间是否存在相互作用。

M. 讨论

关于正链病毒如何复制的研究已经有了飞速的进展。复制与膜相关的证据已经是无可辩驳的，但不同的病毒依赖不同的膜（表 8.4）的原因目前仍复制复合体不清楚。

复制复合体包括病毒编码的几种功能不同的蛋白质。这些复制复合体通过与其他成分相互作用的膜结合蛋白或其结构域在相关膜上进行装配，这些膜装配的协调和复制复合体的成分不仅通过组分蛋白质（和核酸）之间的相互作用控制，也通过它们表达的方

式所控制。因此，在某些情况下，一部分组分蛋白质利用移码或通读表达，而在另外一些情况下，它们由多聚蛋白以确定的方式加工产生。但一些方面仍然不十分清楚，例如，为什么移码和通读发生的比例只有核糖体到达这一结构的位点次数的5%～10%，然而在复制复合体中，产物（至少TMV是如此）被包装的比例是1∶1。

参与复制复合体的寄主蛋白质目前刚刚开始研究和鉴定。相关的翻译起始因子在研究翻译和复制之间的协调时尤其重要。然而，这两种功能沿两个不同的方向操作模板RNA，翻译是由5′→3′，而复制是由3′→5′，因此，一定存在操控装置来避免这两个过程的相互干扰。

在复制中涉及的多数RNA元件以顺式操作表明，RNA模板在复制复合体中是必需的部分。位于模板RNA 3′端起始负链合成的元件已得到明确鉴定。这与位于基因组RNA 5′端起始正链合成的元件的研究形成对照。很有可能，负链和正链合成是高度协调的，一旦正链模板被体内复制复合体“捕获”，RNA复制将会发生。多数体外复制系统缺乏正链的合成，这表明提取时丢失了一种重要的因子，或者存在一些构象限制将体内复合体限定在某一位置。对TBSV pX（参见第Ⅳ节L.2）的观察结果说明可能有寄主特异性顺式作用元件存在。若能阐明正链是否普遍具有这一特征以及这种寄主专化性的本质将是很有意义的。

第Ⅴ节　负义单链RNA病毒的复制

A. 植物弹状病毒科

弹状病毒有包膜的大型粒子，含有一种负义单链RNA（参见第2章第Ⅲ节G一般的描述和第6章第Ⅶ节A基因组组构）(*Rhabdoviridae*)（Jackson *et al.*，1999）。基本上，病毒粒体RNA和核壳体蛋白质（N）结合形成盘绕核衣壳；一较大蛋白质（L）被认为是复制酶，也和核衣壳结合。核衣壳被包在基质蛋白（M）中，然后被包装在包膜内形成杆菌状粒子。病毒编码的糖蛋白（G）跨越该膜。研究表明（Cartwright *et al.*，1972）在N、M和G蛋白之间存在结构的相互作用。总体结构和复制与动物弹状病毒的相似，但存在一些不同。例如，所有脊椎动物的弹状病毒，和一些植物弹状病毒一样，其复制和装配在细胞质中完成，而另外一些植物棒状病毒是在核中复制的。

弹状病毒的负链基因组具有两个功能，作为各基因的mRNA转录模板（参见第7章第Ⅳ节A.1）而且通过全长的正链作为复制的模板。聚合酶复合体担任两种功能，但是其转换机制仍不十分了解，即使是被大量研究的侵染动物的水泡性口炎病毒也是如此（Rodriguez and Nichol，1999）。

1. 对复制的细胞学观察

因为弹状病毒的个体较大且形态独特，它们在被侵染细胞的超薄切片中特别易于被研究。在形态学上将它们分为3类。

第一类细胞核弹状病毒属病毒（nucleorhabdoviruses）。它们聚集在核周隙（perinuclear space），一些粒子散布在细胞质中。该一些病毒的结构类似于在核内看到的内部核蛋白中心。核周隙的一些粒子的包膜与核膜的内部薄层相连续。图8.18表明了该

组病毒在细胞内分布情况的一个例子。

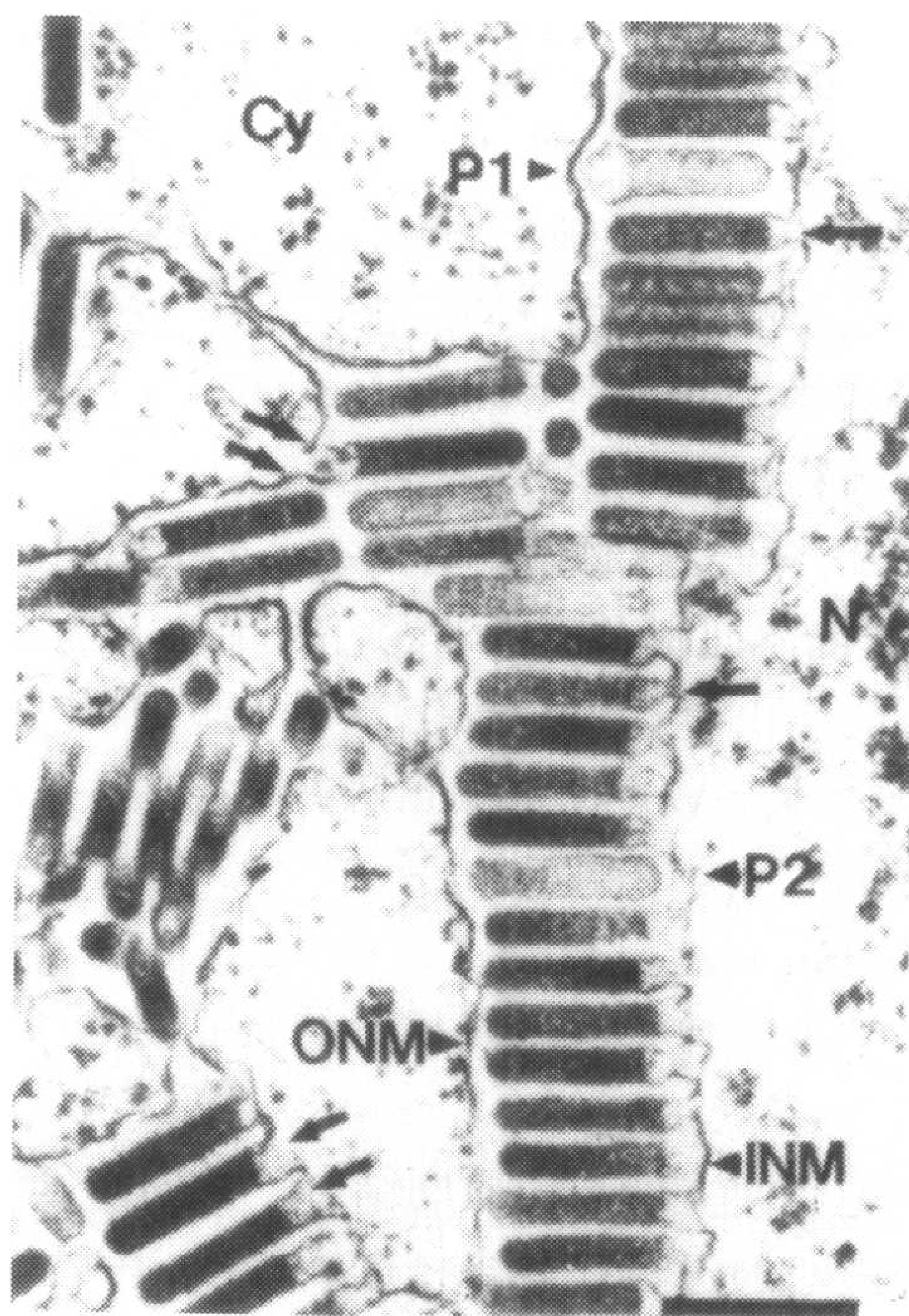


图8.18 被玉米花叶弹状病毒夏威夷分离物侵染的玉米叶片超薄切片的电子显微照片。病毒粒子显然通过细胞核内膜(INM)以及通过细胞核外膜(ONM)的细胞质内的延伸(双箭头)出来;单箭头指出了INM的缢痕。病毒粒子在P1和P2的排列暗示了出芽部位存在于ONM。Cy,细胞质;N,细胞核。比例尺=0.3 μm经允许,引自McDaniel等(1985)。

用抗血清的免疫金标记PYDV的5个结构蛋白表明，病毒蛋白主要在核中积累(Lin *et al.*, 1987)。原位杂交表明负链基因组RNA仅在被侵染植物的核中被发现，然而正链RNA序列则在核和细胞质中均有(Martins *et al.*, 1998)。荧光免疫检验和金免疫标记显示N和L蛋白在核的病毒质中，而M2蛋白质通常分布于细胞核中。

第二类中的细胞质弹状病毒属病毒(cytorhabdoviruses)，如LNYV，成熟病毒的粒子和内质网(ER)相连，而且粒子聚集在网状体的小泡中。生物化学的证据表明该组成员的侵染早期阶段与核相关。

第三类与弹状病毒的核衣壳核心(nucleocapsid core)相似，但缺少周围的膜结构(Francki *et al.*, 1985a)。

当检查细胞中的弹状病毒时应注意，它的外部核膜与内质网相连。因此，细胞核弹状病毒穿过内核膜进入核周隙后，可能进一步被包含在起源于外膜并且在细胞质中被发现的小泡中。同样地，由于细胞质弹状病毒与内质网结合，可能会影响外核膜的外部形态。

2. 细胞核弹状病毒属病毒（nucleorhabdoviruses）

关于SYNV的许多研究已经完成，所以已经建立了关于复制的相当详细的图景。

a. 体外研究

盐提取步骤被证明可以有效地从被SYNV侵染的烟草（*Nicotiana edwardsonii*）叶组织中分离出有活性的聚合酶复合物（Wagner *et al.*，1996）。聚合体外酶反应的产物，包括全长的mRNA、聚腺苷酸化N mRNA、M2 mRNA和正链前导RNA。动物弹状病毒正链前导序列转录物不发生聚腺苷酸化，这表明，SYNV这一个特征可能反映它的复制发生在核内。聚合酶复合物由N、M2和L蛋白组成（Wagner and Jackson，1997），而且添加L蛋白的抗体抑制了该体外聚合系统。该系统的反应条件支持sgRNA的转录优先于负链复制可能是由于提取过程中N蛋白的损耗所致。可以形成一些小的病毒义链RNA（virus-sense RNA），据推测正链RNA的特异信号序列抑制了基因组负链的形成（Wagner and Jackson，1997）。

b. 复制

下列各项步骤描述了细胞核弹状病毒属病毒的复制过程［图8.19（A）］（Jackson et al.，1999）。

（1）病毒粒子进入细胞后便立即与内质网结合，并向细胞质内释放核衣壳核心。

（2）一般认为核衣壳核心通过核孔复合物进入核内。

（3）最初利用掺入核衣壳核心内的L蛋白转录mRNA，然后转运到细胞质内并进行翻译。

（4）核心聚合酶蛋白质N、M2和L被转运回核中，在核内它们起始基因组的RNA复制并进一步合成mRNA。

（5）含有N、M2和L蛋白电子致密粒状的病毒质在核周缘附近形成，这是病毒的复制位点。

（6）在复制后期，M蛋白与新的核衣壳核心结合并盘绕其上。该复合物随后与集中在内核膜上的G蛋白结合。

（7）新的病毒粒子以出芽的方式进入核周隙。

3. 细胞质弹状病毒属病毒（cytorhabdoviruses）

有关细胞质弹状病毒属病毒分子细节方面的研究很少，多数信息来源于细胞学方面的研究。

侵染循环的特征见图8.19（B），并由Jackson等进行了总结（1999）。在侵染早期，一些细胞质弹状病毒，如LNYV，诱导外核膜的水泡（blister）形成含有病毒粒子的小泡vesicle。这些变化在其他病毒如BYSMV中没有被发现。在这两种情形下，在与内质网密集网络紧密伴随的细胞质内均存在着一些纤维状病毒质团。新合成的病毒粒子以出芽的方式进入源于内质网的小泡内。

FLSV的3个主要的结构蛋白为：G、N和M蛋白。除了N蛋白在病毒质的粒状基质（granular matrix）中被发现之外，其他的均在病毒质的周边被检测到（Lundsgaard，1992）。类似的免疫细胞学研究（immuno-cytological study）表明FLSV的G

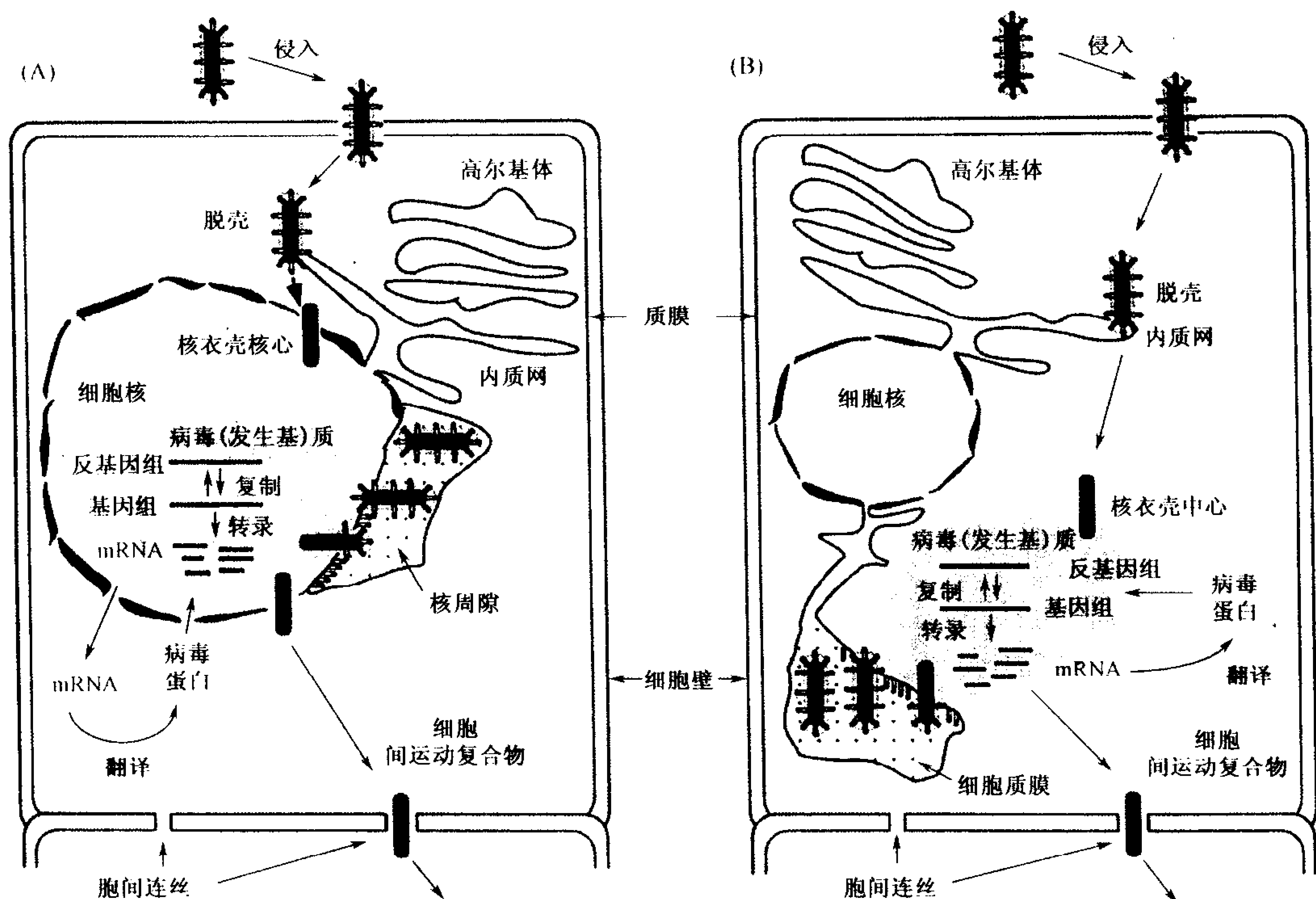


图8.19 植物细胞核弹状病毒属病毒(A)和细胞质弹状病毒属病毒(B)的复制循环模型。经允许,引自 Jackson 等(1999)。

蛋白存在于内质网和核周膜（perinuclear membrane）中而不是在高尔基体里（Lundsgaard，1995）。

B. 番茄斑萎病毒属病毒（tospoviruses）

番茄斑萎病毒属病毒的基因组由 3 个 RNA 片段所组成：L、M 和 S，包装于有包膜的粒子内（其基因组组构见图 6.11）。RNA L 是负链而 M 和 S 则具有双义策略（参见第 7 章第Ⅳ节 A.2）。病毒粒体共含有 4 种结构多肽（图 5.42）。其中两种糖基化蛋白（G1 和 G2）位于表面。N 蛋白与 RNA 结合，还存在由 RNA L 编码的数量较少的一种大分子蛋白 RdRp。依据这些和其他的性质，番茄斑萎病毒属病毒被归类于布尼亚病毒科，这是可在脊椎动物和无脊椎动物中复制的大病毒科。

关于番茄斑萎病毒属病毒的复制，除了发生在高尔基体叠层（Golgi stack）膜密切相关的细胞质中外，其他的细节所知甚少。ER 潴泡内的双层膜粒子可能是基于高尔基体的粒子与 ER 融合的结果（Kitjima *et al.*，1992；Kikkert *et al.*，1997）。一般认为番茄斑萎病毒属病毒的复制与布尼亚病毒科的其他病毒类似，即通过 N 蛋白的浓度从病毒 mRNA 的产生转换为病毒基因组的复制（Storms，1998）。关于布尼亚病毒科病毒的复制见 Elliott（1999）的综述。

第Ⅵ节　双链 RNA 病毒的复制

植物呼肠病毒

呼肠病毒科的植物成员被分为 3 个属：植物呼肠病毒属病毒具有 12 条双链 RNA 基因组片段，代表性成员是 WTV；斐济病毒属病毒具有 10 条双链 RNA 基因组片段，代表性成员是 FDV；水稻病毒属病毒同样具有 10 条双链 RNA 基因组片段，代表性成员是 RRSV（关于基因组结构，参见第 6 章第Ⅵ节 A）。关于植物呼肠病毒（plant reoviruses）复制的分子方面目前所知甚少，但是它们很可能与动物呼肠病毒类似（Joklik，1999）。

1. 复制在细胞内的位点

植物呼肠病毒和那些感染哺乳动物的病毒一样，在细胞质内复制（Wood，1973）。随着侵染，在细胞质中出现着色较深的病毒质（图 8.20）。

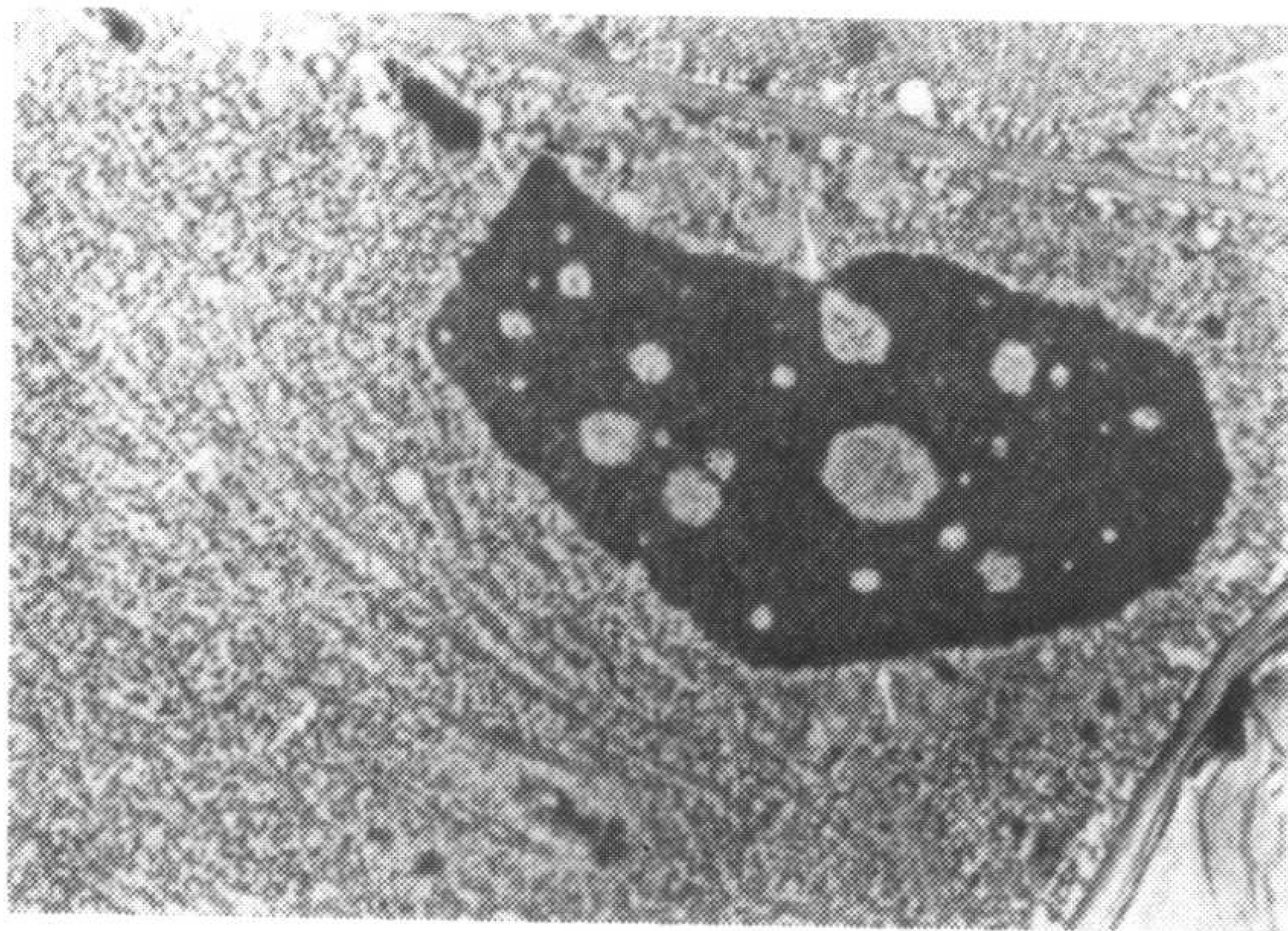


图8.20　玉米粗缩病毒侵染的玉米的叶片叶脉瘤细胞。由 MRDV 诱导的3种不同的内含体很容易分辨：病毒质（箭头），内部排列有病毒粒子的细胞质的微管（双箭头），病毒晶状体的一部分（右上部）。经允许，引自 Bassi 和 Favali(1972)。

与被侵染的植物细胞一样，在被 WTV 感染的叶蝉不同组织的细胞中均出现了病毒质（Shikata and Maramorosch，1967）。免疫荧光检验法证明在叶蝉细胞的细胞质中存在病毒抗原（Chiu *et al.*，1970）。仍然不能找出 WTV 复制的体外研究结果与观察到的细胞学结构的关系。

通过用^{3}H 标记的尿嘧啶掺入被斐济病毒属的 MRDV 侵染的玉米细胞的酶消化实验和放射自显影分析表明，病毒质是由蛋白质——很可能是病毒蛋白组成。在病毒质内，合成病毒的 RNA 和装配成熟的粒子。成熟的粒子移入细胞质，在细胞之内可能①保持粒子的分散状态；②形成水晶的排列；③包装进或结合于类似蛋白质结构的管状物上（图 8.20）（Bassi and Favali，1972；Favali *et al.*，1974）。放射自显影研究并没有能揭示病毒复制与核、线粒体和叶绿体的关系。

电子显微镜的细微研究支持由FDV在甘蔗中所引起的病毒质是病毒合成和装配的位点这一观点（Hatta and Francki，1981c）。病毒质主要由蛋白质和双链RNA组成。一些区域含有很多直径50～60 nm的等轴粒子。一些看来是空壳而另一些含有较高染色密度的双链RNA芯。这些粒子看来是不完整病毒粒子或核心。完整的病毒粒子只在细胞质内被看到。

2. RNA的包装

呼肠病毒面临的一个问题是用于包装的子代的选择。每个粒体含有基因组的所有10个或12个双链RNA的每一个拷贝。所有WTV粒体包含每个基因组片段一个拷贝的证据是：①从病毒分离的RNA的每个片段的摩尔浓度相同（Reddy and Black，1973）；②侵染可以由一个单独的粒体起始（Kimura and Black，1972）。因此，在病毒装配期间使得所有10个或12个基因组片段中的每一片段只有一个分子出现在每一粒体中的大分子识别信号是什么？例如，WTV 12个片段的包装估计涉及12种不同的蛋白质-RNA或RNA-RNA特异性互作。

可能与这个问题相关的第一种证据来自于Anzola等（1987）的研究。他们确定了有缺损的（DI）基因组片段5的结构，该结构因内部缺失而只有功能性RNA S5的1/5长度。然而，这个DI RNA与正常序列一样，每个粒子包装一个DI拷贝。因此，他们认为参与包装的序列存在于正链5′端的319个碱基内和3′端的205个碱基内。Reddy和Black（1974，1977）指出，病毒成员中DI RNA的增加导致正常的分子片段的比例对应减少，也就是说，DI片段只和它的亲本分子竞争。因此，一定存在两种识别信号，一种特异地标示一个基因组片段是病毒的而不是寄主的，另一种信号标示12个片段中的每一个。

Anzola等（1987）测出了WTV所有12个基因组片段的5′端和3′端结构区的序列（图8.21）。他们认为在5′端一个完全保守的六核苷酸序列和3′端一个完全保守的四核苷酸序列可能形成了与寄主RNA相区别的识别信号。他们还在保守的片段内测发现了长度可变的片段特异性反向重复序列（图8.21）。他们认为这些可能是每一个基因组片段的特异性识别信号。在RDV的片段9发现一个相似的反向重复（Uyeda *et al.*，1989）。

侵染植物的呼肠病毒科的其他成员都有保守的5′和3′序列（Kudo *et al.*，1991；Mertens *et al.*，2000）。具有分节段的单链RNA基因组的流感病毒，在每个基因组片段的5′端和3′端也具有类似的保守序列（Stoeckle *et al.*，1987）。这些相似性支持了5′端和3′端序列在RNA基因组片段包装过程中起重要作用这一观点。然而，问题仍然没有解决。如果只有RNA参与识别，包装时如何正确识别一整套12个双链RNA？如果蛋白质-RNA识别很重要，如何从存在于病毒核衣壳核心的已知3种蛋白质构建成12个特异性位点？

3. 复制

对呼肠病毒而言，负链的合成以结合在微粒组分（particulate fraction）上的正链为模板，由病毒复制酶完成（Acs *et al.*，1971）。这些和其他相关的结果导致提出了以

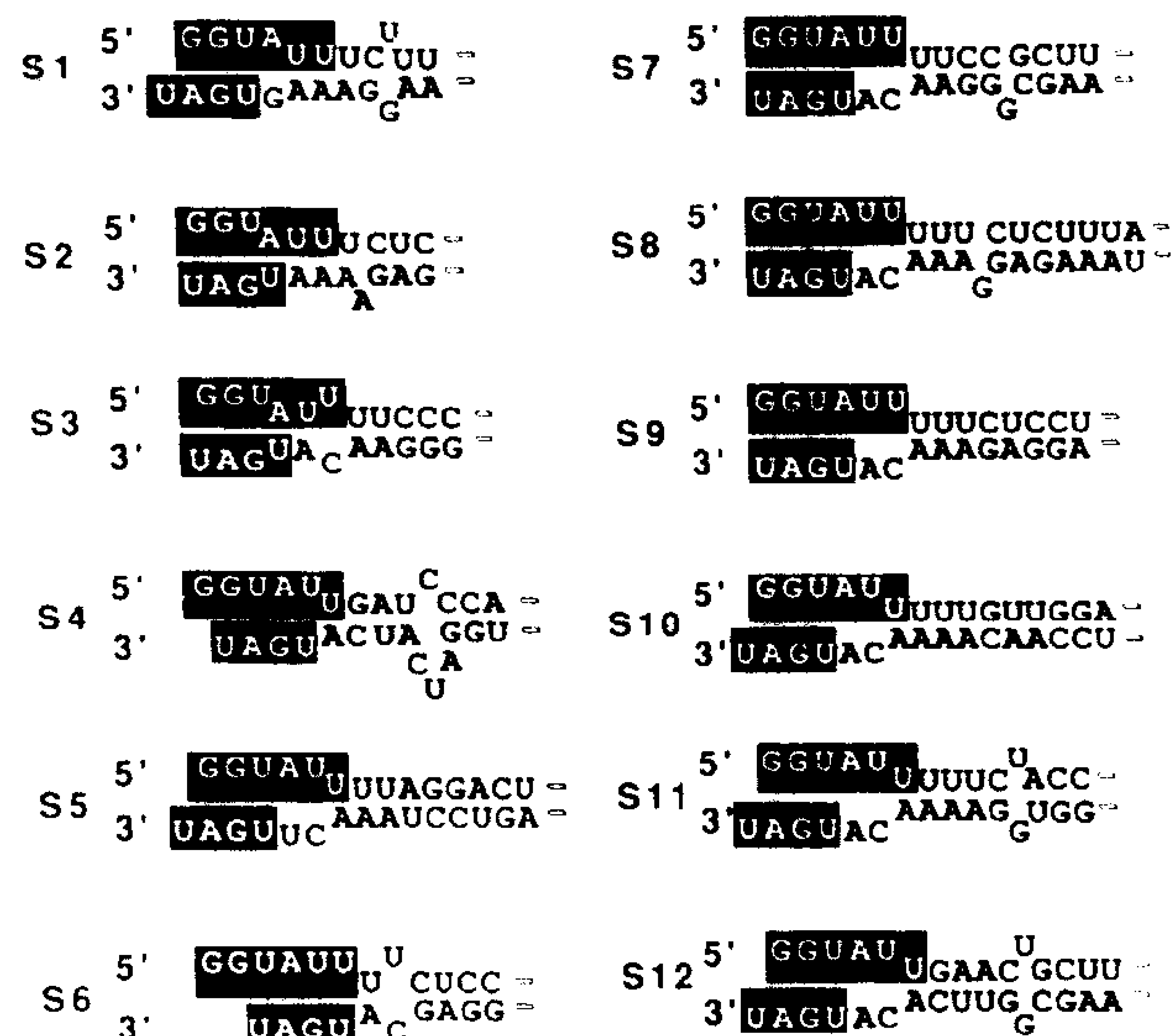


图8.21 WTV 12个基因组片段正链的末端序列域。靠近5′端和3′端的片段特异性反向重复的定向存在，表明存在潜在的基于碱基配对的相互作用。12个基因组片段共有的保守5′端六核苷酸和3′端四核苷酸用黑背景中的白色表示。承蒙版权所有者（The National Academy of Sciences）惠允，引自 Anzola 等（1987）。

下观点：dsRNA 在发育着的病毒粒子的新生核心内形成，而且它们一直存在于病毒粒子里面。如果这是真的，那么这一机制几乎无疑地适用于所有植物呼肠病毒。这意味着导致一套 12 个基因组 RNA 的正确选择机制涉及正义单链 RNA。因此，如图 8.21 所示碱基对反向重复序列可能是其识别信号。可能是只有短暂出现在形成中的核心中的病毒编码的其他“支架”蛋白质参与了 RNA 的识别，或者是与成熟的粒子中存在的三种蛋白质一起发挥作用。

Xu 等（1989b）构造了一系列可以精确转录 S8 RNA 和 4 种仅在 3′端有区别的类似物。他们的实验提供了 3 方面的证据证明 5′端和 3′端区域以某种功能方式互相作用：核酸酶 T1 敏感性测定显示即使 3′端序列微小的改变也可以影响 5′端的构型。改变 3′端以增加 3′端与 5′端碱基配对的潜能可以轻微降低体外翻译，而减少碱基配对的潜能则会使翻译增加。

通过计算机模拟（modeling）WTV 的 6 个转录物的最小能量结构预测出末端反向重复序列发生了碱基配对的构型。

Dall 等（1990）利用其建立的凝胶阻滞分析法（gel retardation assay）证明，WTV 的转录物可以与来自被感染的叶蝉细胞培养物的提取物中的一种成分发生选择性结合。利用在末端修饰和内部缺失的转录物，确定了存在于末端区域的片段特异性反相重复是最佳结合所必需的，但不是充分条件。内部序列的参与也是必需的。没有证据表明能够区分来自不同片段的转录物在包装方面的差异。还没有深入地研究在侵染细胞中存在而在健康细胞中没有的这类结合组分的特性。

第Ⅶ节 副反转录病毒的复制

花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）是唯一具有双链DNA基因组的植物病毒科，参见第2章（第Ⅲ节A）对此科的描述。1979年时，关于这一类病毒的复制还所知甚少，但此后则有了迅速的进展。这是由于存在着两种主要的推动因子：首先，因为这些病毒具有双链DNA基因组，人们期望其可成为有效的植物基因载体。这方面内容将在第16章第Ⅸ节中讨论。其次，因认识到该DNA是通过反转录过程进行复制的，人们对这类病毒的研究有广泛的兴趣。

本科包括6个属，形成两大组群，花椰菜花叶病毒组和杆状DNA病毒组。这两组基因组结构存在差异，但其复制手段实质上是相同的。关于花椰菜花叶病毒组的CaMV和杆状DNA病毒组的RTBV的大量研究已经完成。Hohn等（1985）、Hull等（1987）、Pfeiffer等（1987）、Mason等（1987）、Hull（1996），还有Hohn和Futterer（1997）先后进行了综述。

尽管花椰菜花叶病毒科成员的复制有反转录阶段，并且在许多方面和反转录病毒（retrovirus）相似，但是在几个重要方面与反转录病毒不同：

（1）RNA转录复制不涉及将基因组整合进寄主基因组之内而是由一个游离的小染色体完成的。

（2）该类群的病毒不编码整合酶基因。

（3）病毒粒体DNA是环状的双链DNA，而不是带有反录病毒特有的长末端重复序列的线性DNA（这一点和上一点与缺乏整合相关）。

（4）病毒包装在复制循环的DNA阶段，而非反转录的RNA阶段。因此，花椰菜花叶病毒科病毒又称为副反转录病毒（pararetrovirus）。

与反转录病毒比，副反转录病毒的复制循环有两个阶段：①细胞核阶段指病毒DNA由寄主依赖于DNA的RNA聚合酶进行转录；②细胞质阶段指在细胞质内转录产生的RNA由病毒编码的依赖于RNA的DNA聚合酶或者反转录酶（RT）反转录产生DNA。在反转录病毒中，反转录酶活性是*pol*基因的一部分，*pol*基因还包括可除去复制中间体RNA：DNA的RNA的RNase H活性。*pol*基因（蛋白质）是gag-pol多聚蛋白的一部分，由天冬氨酸蛋白酶切开，gag类似于外壳蛋白。在副反转录病毒中，反转录酶和RNase H活性密切相关。在杆状DNA病毒属病毒中，外壳蛋白和pol由相同的可读框表达，但是在花椰菜花叶病毒中，它们则分别由单独的可读框表达（图6.1、图6.3和图6.4）。所有的植物副反转录病毒均编码一种天冬氨酸蛋白酶。

A. 反转录酶

大多数关于反转录病毒pol的研究已经完成。反转录酶有一个特征性的模体：酪氨酸-异亮氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸（YIDD）和一些氨基酸模体识别RNase H。用天冬氨酸蛋白酶处理人类免疫缺陷病毒（HIV）的66 kDa pol区域，除去RNase H区域后产生一个66 kDa和51 kDa蛋白质的异质二聚体。该酶复合体具有依赖于RNA的DNA聚合酶、依赖于DNA的DNA聚合酶和RNase H活性，将单链RNA转换为双链

DNA。HIV 反转录病毒的 3.5 Å 分辨率的晶体结构已确定（Kohlstaedt *et al.*，1992），并表明具有一个类似前面描述过的 RdRp 的右手螺旋结构（参见第Ⅳ节 B.1）。

通过序列比较首次表明，CaMV ORF Ⅴ 的产物和反转录病毒的 *pol* 基因产物类似（Toh *et al.*，1983）。ORF Ⅴ编码蛋白的 N 端区域有一个天冬氨酸蛋白酶模体（Torulella *et al.*，1989），可以自催化切开来自 ORF Ⅴ转录物在体外翻译的蛋白质的 N 端的多肽二联体（doublet of polypeptide）（20 kDa 和 22 kDa）。蛋白酶活性位点的突变分析尚未进行。这种和其他特征相吻合的复制循环将在后面讲述。ORF Ⅴ在酵母中表达产生一个 60 kDa 蛋白质，且在一个合成的模板上具有反转录活性（Takatsuji *et al.*，1986）。相反地，ORF Ⅴ在大肠杆菌中表达一个 78 kDa 蛋白质，大小与预计的 ORF 相符，但是它没有任何的反转录活性。活性胶分析揭示，与 CaMV 粒子结合的反转录活性也是 60 kDa（Takatsuji *et al.*，1992）。缺失分析表明，将在大肠杆菌表达的蛋白质的 N 端 143～185 间的氨基酸去除，则具有和在酵母内表达蛋白质相似的反转录活性。这暗示着 CaMV 反转录酶先翻译成一个没有活性的前体，然后经过蛋白酶水解过程转变为有活性的蛋白质。并推测水解过程由 N 端的天冬氨酸蛋白酶来完成。

pol 模体位于杆状 DNA 病毒组的 ORF Ⅲ的 C 端部分，并且 RTBV 的 pol 已经在昆虫的细胞中进行了研究（Laco and Beachy，1994）。预期的 87 kDa 产物被检测到，并且被加工成 62 kDa 和 55 kDa 蛋白质。序列分析表明这些蛋白质具有相同的 N 端。这些蛋白质都表现了反转录酶活性和 DNA 聚合酶活性，但只有 55 kDa 蛋白质具有 RNase H 活性。62 kDa 和 55 kDa 蛋白质的精确分子质量由质谱分析确定，使 C 端得以鉴定（Laco *et al.*，1995）。推断的天冬氨酸蛋白酶活性位点的突变抑制了 87 kDa 蛋白质在昆虫细胞内的加工。使用对 RTBV ORF Ⅲ产物的特定片段的抗血清，Hay 等（1994）在感染植物提取物内检测到了一个与天冬氨酸蛋白酶相符合的 13.5 kDa 蛋白质。蛋白酶抗体标记在病毒粒子的表面。用反转录酶区域的抗体鉴定出 68 kDa、65 kDa 和56 kDa 3 种蛋白质，后两者可能与在昆虫细胞中基于 ORF 表达的 62 kDa 和 55 kDa 蛋白质相符（Laco and Beachy，1994）。

反转录酶核心模体内 Y^{1339}、D^{1341} 和 D^{1342} 的突变导致了反转录酶活性的丧失，而 I^{1340} 的突变则没有影响（S.-C Lee and R. Hull，未发表的资料）。

B. 花椰菜花叶病毒组的复制

有大量与 CaMV 核酸复制和反转录现象有关的文献。多数在这一节开始的综述中提到过。这里只介绍一些关键的或者最新的文献。

1983 年之前，CaMV 核酸复制多方面研究导致 3 个研究小组推测 CaMV DNA 通过一个涉及 RNA 中间体的反转录过程进行复制（Guilley *et al.*，1983；Hull and Covey，1983；Pfeiffer and Hohn，1983）。导致这一模型的一些观察结果如下：

（1）产生带有末端重复序列的全长 RNA 转录物（Covey and Hull，1981）。

（2）病毒粒子内的 DNA 有不连续性（图 6.1），然而在核中没有不连续性，而是呈超螺旋状并与组蛋白结合形成微型染色体（Ménissier *et al.*，1982；Olszewski *et al.*，1982）。

（3）双链 DNA 以扭结的形式存在（图 4.10）。

细胞内存在其他形式的 CaMV DNA 不被包装，例如，具有与 α 链同样极性的 625 nt单链分子，可共价连锁于大约 100 个核糖核苷酸的链上（Covey *et al.*，1983）。

自从 1983 年以来，CaMV 复制的详细示意图已经建立起来了。

1. 复制路径

图 8.22 概略地说明了 CaMV 的复制路径。本质上，复制分两个阶段，以病毒粒体 DNA 为模板转录 RNA，然后以 RNA 为模板反转录产生双链 DNA。转录阶段发生在细胞核内，反转录阶段发生在细胞质中。在复制的第一个阶段，侵染粒子的 dsDNA 移入细胞核，在核内位于缺口位置重叠的核苷被去除，然后再共价连接形成一个完整的闭环 dsDNA。共价连接闭环 dsDNA 和寄主组蛋白结合形成微型染色体，作为寄主酶依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶Ⅱ的模板，转录形成 19S 和 35S 两种 RNA，如图 6.1 所示。有关复制的细节在第 7 章第Ⅳ节 D 中叙述。

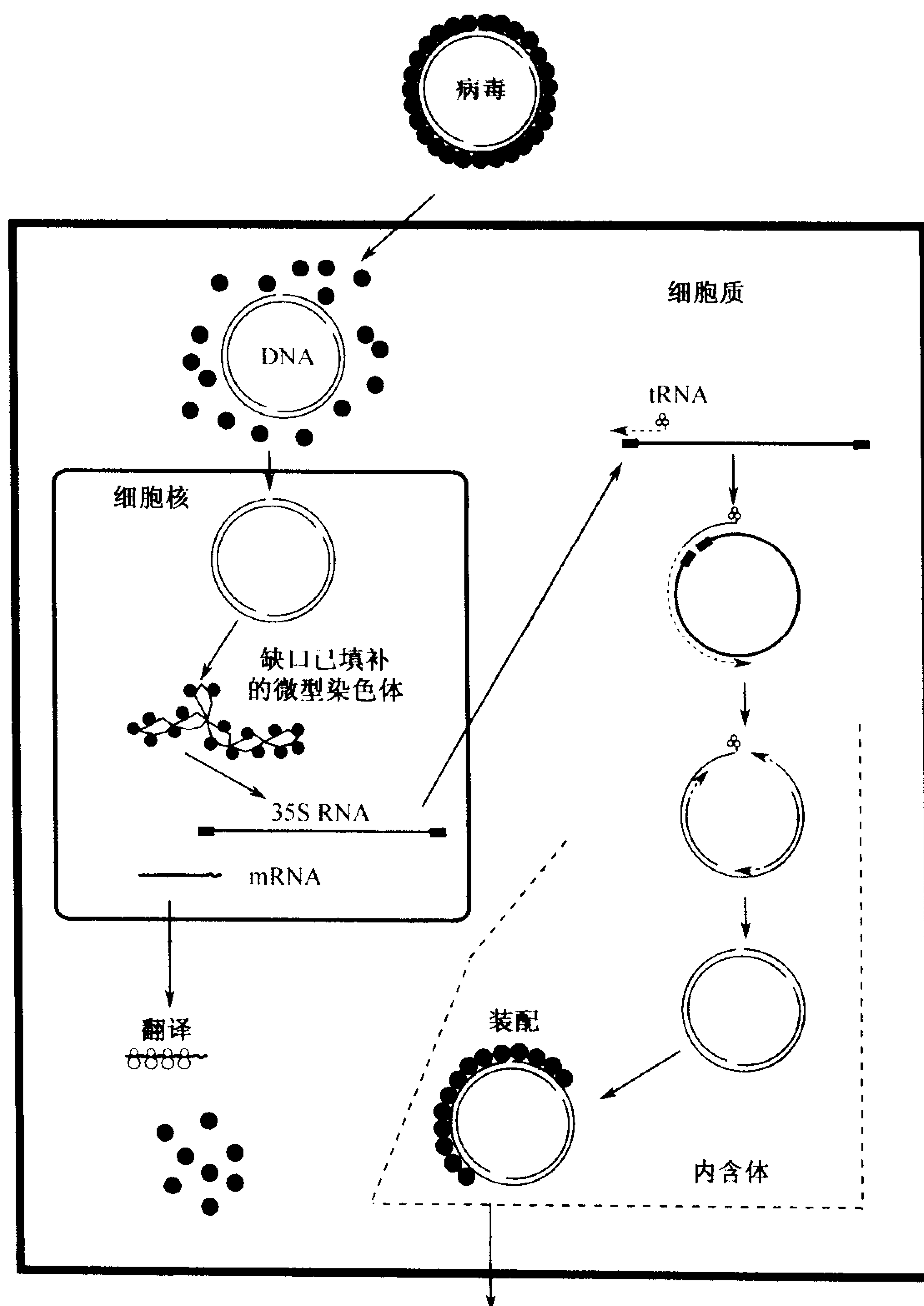


图8.22 CaMV 复制循环的示意图。

两种多聚腺苷酸化的 RNA 进入细胞质，在病毒质内完成复制循环的第二个阶段（Mazzolini *et al.*，1985）。19S RNA 是基因Ⅵ的 mRNA，能大量翻译产生病毒蛋白质。基因Ⅵ是唯一被其自身启动子转录为独立的转录物的花椰菜花叶病毒基因，暗示着它可能在侵染早期起着重要的作用（Gowda *et al.*，1989）。基因Ⅵ编码区的突变表明，与反式激活有关的是蛋白质产物而非 mRNA，对此在第 7 章第Ⅴ节 B. 7 中已有更详细的描述。

以 35S RNA 为模板开始合成病毒 DNA，一个植物 Met-tRNA 分子在它的 3′端与对应于 α 链 DNA 的 D1 缺口下游的 35S RNA 的位点处形成超过 14 个碱基的配对（见下文）。病毒的反转录酶起始 DNA 负链的合成，且持续合成直到它到达 35S RNA 的 5′端，利用 RNase H 活性除去 RNA：DNA 双链中的 RNA 分子，得到称为强终止（strong-stop）DNA 的小分子。在此处，需要酶转换到 35S RNA 的 3′端继续复制。该转换可能由位于 35S RNA 每个末端的 180nt 的直接重复序列促成，可以使强行终止 DNA 的 3′端与 35S RNA 的 3′端杂交。当模板转换完成时，35S RNA 的反转录持续到 tRNA 引物的位置，tRNA 引物在新的合成 DNA 上被置换和降解形成 D1 缺刻。

使用过的 35S 模板的其余部分被 RNase H 移除。在这一个过程中，RNA 的两个聚合嘌呤片段（PPT）留在第二条链（正链）上的 D2 和 D3 缺口位置附近。DNA 的正链的合成始于这两个 RNA 引物。延长的正链必须通过负链上的 D1 缺口，也涉及一次模板转换。

有很多观察数据支持该 CaMV 复制模型（Hohn and Fütterer，1997）：

（1）正链和负链 DNA 的合成对蚜肠霉素（aphidocolin）这类 DNA→DNA 合成的抑制子均有抗性。

（2）反转录酶活性与病毒的内含体和病毒粒子相关。

（3）已分离到被看作复制中间体的各种未被包装的核苷酸分子。这包括在 5′端具有核糖核苷酸的强终止 DNA，与有缺陷复制和发夹结构相一致的部分双链和部分单链的 DNA 分子（Turner and Covey，1988）。

（4）复制中间体和明显不完全病毒粒子相结合（Thomas *et al.*，1985；Marsh and Guifoyle，1987；Füttere and Hohn，1987）。

在内含体、病毒粒子和病毒粒子内反转录酶活性以及在病毒粒子内复制中间体的发现表明，与反转录病毒相比，CaMV 的反转录发生于类似粒子的前病毒结构内。

2. 内含体

如在前面章节已提到，CaMV（和花椰菜花叶病毒科的其他病毒）在侵染的寄主细胞细胞质内诱导产生有特征的内含体或病毒质（图 8. 23）。

存在两种形式的内含体，电子致密的包含体由 ORF Ⅵ产生，而电子透明的由 ORF Ⅱ产生（Espinoza *et al.*，1991）；两种类型的内含体中都有病毒粒子。电子致密的内含体是子代病毒 DNA 合成和病毒粒子装配的场所；但还不知道病毒复制是否发生于电子透明的内含体内。病毒的外壳蛋白看来局限于内含体内，而且大多数的病毒粒子存在于内含体中。

在其发育的早期阶段，由 ORF Ⅵ产生的内含体以电子致密基质的很小斑点出现在

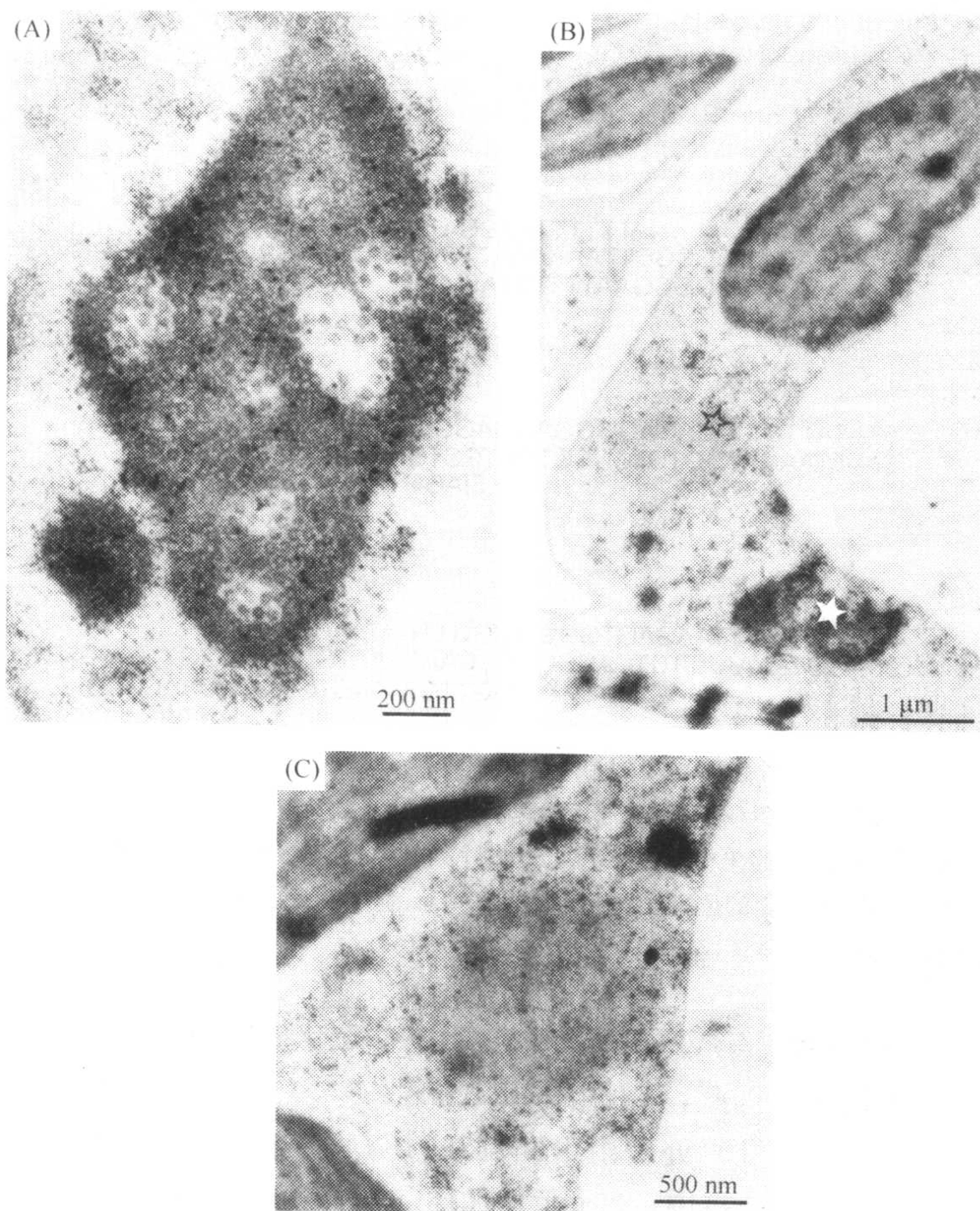


图8.23 在被侵染的芜箐叶片中用抗 P62（ORF Ⅵ的产物）的抗血清免疫金标记的 CaMV Cabb B-JI 株条内含体的电子显微照片。(A)金粒子优先标记的电子致密内含体基质。(B)细胞显示一个被大量标记的电子致密内含体(实心五角星)，在同一个细胞内还含有无金粒子标记的电子透明的内含体(空心五角星)。(C)无金粒子标记的电子透明内含体。经允许，引自 Espinoza 等(1991)。

细胞质内，并被很多的核糖体包围。较大的内含体可能依靠生长或者合并那些较小的内含体而形成成熟的内含体，大小变异较大，直径范围为 0.2～20 μm。内含体通常球形，没有膜边界。具有不被膜包裹的一些电子透明区域，由精细的粒状基质所组成，在外围有核糖体。病毒粒子不规则或离散的簇生于透明的区域和基质内。

CaMV 粒子装配的方式还不清楚。在被侵染的组织中没有发现空的病毒外衣壳。这些观察间接表明包装和 DNA 的合成可能紧密相关。外壳蛋白的糖基化和磷酸化的作用还有待于研究。

3. 不连续区

花椰菜花叶病毒组的 DNA 在特定的位点具有缺口（gap）或不连续区（discontinu-

ity)，一个不连续区（D1）在一条链（正链或 α 链）上，其他的则在另一条链上。CaMV 的缺口已经被详细研究过，结果表明，包含一个 5′端固定位置和 3′端可变位置的重叠序列，重叠幅度为 8～40 nt（图 8.24）（Richards *et al.*，1981）。

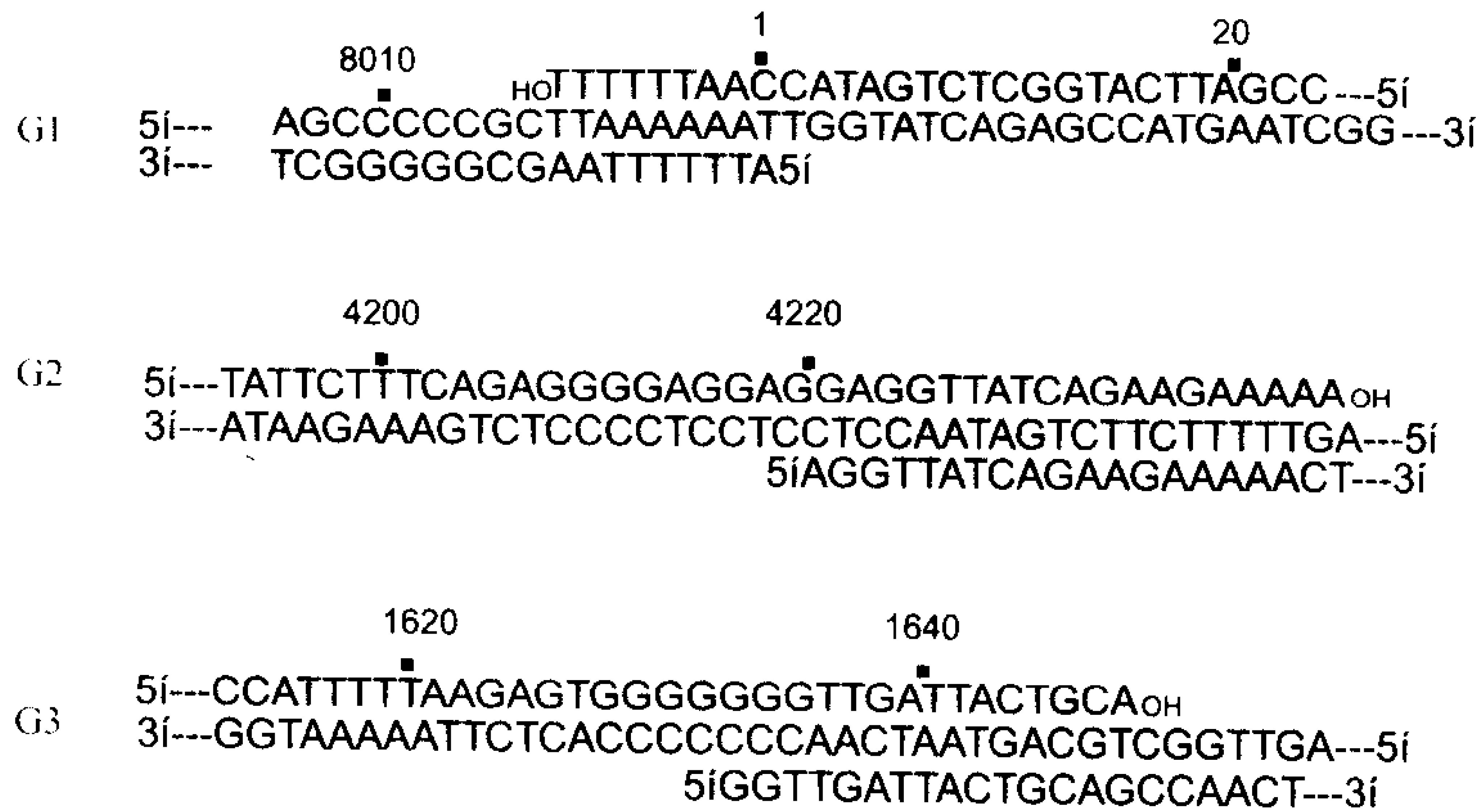


图8.24 CaMV 基因组 DNA 中的缺口或不连续区的结构。G1（也被称作 D1）位于被转录的 α 链，G2（D2）和 G3（D3）位于互补链。对于每一个缺口，上部和下部序列是不连续链的序列，中间序列是未中断链的序列。这些序列是已发现的最普通的序列，但对每个序列而言，5′端在固定的位置，3′端可能不同于所示的位置。每个序列上面的数字表示其在 CaMV 序列中的位置。经允许，引自 Richards 等(1981)。

依照前面的解释（参见第Ⅶ节 B.1），这些不连续区发生于复制过程中向前延伸的 DNA 链到达引物的位置。因此，D1 在合成负链的 tRNA 引物位置，其他缺口则产生在 RNA 的多聚嘌呤片段（PPT）处，由 RNase H 切割形成正链的引物。在对 PPT 伴随的正链引发（priming）的分析中，Noad 等（1998）表明改变 13bp PPT 的长度（约±25%），可以明显降低引发效率，但是对距离 PPT 3′端 3nt 的新合成正链 DNA 的 5′端位点没有影响。PPT 5′端上游的短嘧啶片段在 PPT 的体内识别中扮演着重要角色。Noad 等（1998）提出了副反转录病毒正链起始的一个模型，即嘧啶可以增进在 RNase H 切割时的 PPT 识别，并且认为引物成熟的忠实度涉及 PPT 的长度测定和 RNase H 对 3′端的识别。

C. 杆状 DNA 病毒组的复制

研究最详尽的杆状 DNA 病毒组成员 RTBV 的复制，和 CaMV 的很多方面非常相似，并得到了特征性复制中间体的检测结果的支持（Bao and Hull，1994）。强终止 DNA 的 5′端连接着甲硫氨酸起始（initiator）tRNA（Bao and Hull，1993）。然而，正链引物起始位点的不连续区并非位于根据序列推测的 PPT 位点，而是定位于距此处 1400 bp 的一个位点上（Bao and Hull，1992）。此外，这种不连续区的，5′端和 3′端位置是异质的（heterogeneous），即从 10 nt 的缺口到长达 103 nt 的重叠结构。

第Ⅷ节　单链 DNA 病毒的复制

单链 DNA 基因组的植物病毒分为双生病毒科（*Geminiviridae*）和矮缩病毒科（*Circoviridae*）。这两个科成员的复制是单链 DNA 经由双链 DNA 阶段再到单链 DNA。两个科的复制特征在许多方面相似，但也存在一些差异。双生病毒科的复制大部分都已研究清楚。

双生病毒科有 4 个属，基因组组构在第 6 章第Ⅴ节 A 中已讲述。其中 3 个属的病毒，玉米线条病毒属病毒（mastreviruses）、曲顶病毒属病毒（curtoviruses）和番茄伪曲顶病毒属病毒（topocuroviruses）具有单一基因组，而菜豆金色花叶病毒属病毒（begomoviruses）具有由二分体基因组。然而，二组分的菜豆金色花叶病毒的 DNA A 含有病毒复制需要的所有信息，在 DNA B 上的基因编码蛋白质参与到核以及细胞之间的移动（参见第 9 章第Ⅱ节 C 和第Ⅲ节 D. 2. i）。因此，这里提前说明，DNA B 的 BV1 ORF 的核定位特性对于核穿梭是需要的，而讨论其复制时，这些二组分病毒的 DNA A 可以看作和单一组分病毒的 DNA 相类似。

A. 研究双生病毒复制的方法

在阐明双生病毒复制的细节时普遍使用两种方法，整株植物农杆菌侵染和原生质体转染。

Grimsley 等（1987）证明含 MSV DNA 串联重复的土壤杆菌接种到整株玉米植株后，可以导致 MSV 侵染的症状。由于 MSV DNA 不能机械接种，而且完整的病毒只能经由昆虫介体传染，该实验提供了一个土壤杆菌可以和单子叶植物互作的非常灵敏的证明。Elmer 等（1988b）修改了 Grimsley 等（1987）的农杆菌侵染程序，为 TGMV 复制提供一个简单有效的测定法。他们获得了含 TGMV B-DNA 的多重拷贝的转基因的本生烟。他们发现 2000 个含 TGMV A-DNA 的土壤杆菌细胞的接种物即可引起 100% 病毒侵染。农杆菌侵染法也是一种将 DNA A 和 DNA B 一起导入本生烟的高效率的途径之一（Hayes *et al.*，1988e）。该技术也被扩展应用于马唐线条病毒（Donso *et al.*，1988），MSV 在禾本科的不同种（Boulton *et al.*，1989a）及 ACMV 中（B. A. M. Morris *et al.*，1988；Klinkenberg *et al.*，1989）。

利用原生质体研究植物病毒已在第Ⅲ节 A. 5 中描述过。原生质体和土壤杆菌侵染使得突变对病毒基因组的影响得以研究。

B. 双生病毒的体内观察

双生病毒粒体通常在核中积累，其中一些病毒如 MSV 可在核内大量积累。在一些受侵染的细胞中，一些纤维环状物（肯定是球形结构的一部分）出现在核中（Francki *et al.*，1985c），但是它们的成分和重要性仍然未知。从 TGMV 侵染的烟草属植物组织中分离的细胞核合成了不同数量的 DNA A 和 DNA B 的正链与负链（Coutts and Buck，1985）。

C. 滚环复制（Novik，1998）

两项最初的研究结果表明，双生病毒采用滚环机制进行复制。

一项来自 ACMV 侵染的植物提取物双向电泳的结果揭示存在着 5 种推定的复制中间体（Saunders *et al.*，1991）：

（1）伴随着基因组正链 DNA 的亚基因组负链 DNA；

（2）单位长度的负链 DNA；

（3）病毒粒体 DNA 大小在一至两个基因组长度 串联的（concatemeric）病毒粒体单链 DNA；4 双链 DNA；5 部分单链 DNA。

另一项研究是将来自 BCTV 的串联构建物经土壤杆菌接种于本生烟（*Nicotiana benthamiana*）后，该病毒的基因组可以通过复制而释放出来（Stenger *et al.*，1991）。

滚环复制普遍存在于细菌病毒和质粒的复制中。它有两个阶段。第一阶段，正单链作为模板合成负链，生成双链的复制型（RF）。这一复制型具有两个功能：它是在第 7 章第Ⅳ节 F 中描述的转录模板和为正链合成产生自由的单链 DNA 的模板。负链合成通常是通过 RNA 聚合酶或 DNA 引发酶（primase）活性产生的 RNA 分子来引发的。第二阶段，正链合成是由 RF 中正链上的特异位点的切口（nick）引发的。滚环复制也将在第 14 章（第Ⅰ节 D）中叙述。

D. 双生病毒的复制

双生病毒复制循环的许多特征最近已经被阐明（Hanley-Bowdoin *et al.*，1999；Gutierrez，1999；Gutierrez，2000a），虽然仍了解得很少。复制循环的阐明已经揭示正常的细胞周期的一些方面，因为双生病毒复制依赖许多寄主的功能。特别引起注意的是双生病毒可在处于 G 期并已关闭大多数 DNA 复制活性的已分化细胞内进行复制。因此，双生病毒能够重新激活其所要求的复制活性并将细胞转回到 S 期。双生病毒的复制循环过程见图 8.25。

1. 负链合成

与 3′ 端基因间区互补的一个小寡核苷酸已经从一些玉米线条病毒属病毒中分离出来（Donson *et al.*，1984；Hayes *et al.*，1988c；Morris，1992）。此寡核苷酸可以被 DNA 聚合酶在体外延长，因而可能是体内负链的引物。WDV 基因间区 3′的序列参与复制的发现支持这一论点（MacDonald *et al.*，1988b；Kammann *et al.*，1991）。但是在曲顶病毒属或菜豆金色花叶病毒属病毒中没有发现类似分子。ACMV 复制中间体的双向电泳分析表明负链合成从基因间区 5′端起始（Saunders *et al.*，1992）。在玉米线条病毒属和菜豆金色花叶病毒属病毒中发现的引物含有核糖核酸。

对于参与负链合成的蛋白质及合成机制了解得还很少。很可能病毒粒子在复制发生的阶段定位于核内（参见第 9 章第Ⅱ节 C）。因为除了外壳蛋白之外没有病毒编码的其他蛋白质在病毒粒体中被检测到，而且外壳蛋白对于复制不是必需的（Elmer *et al.*，

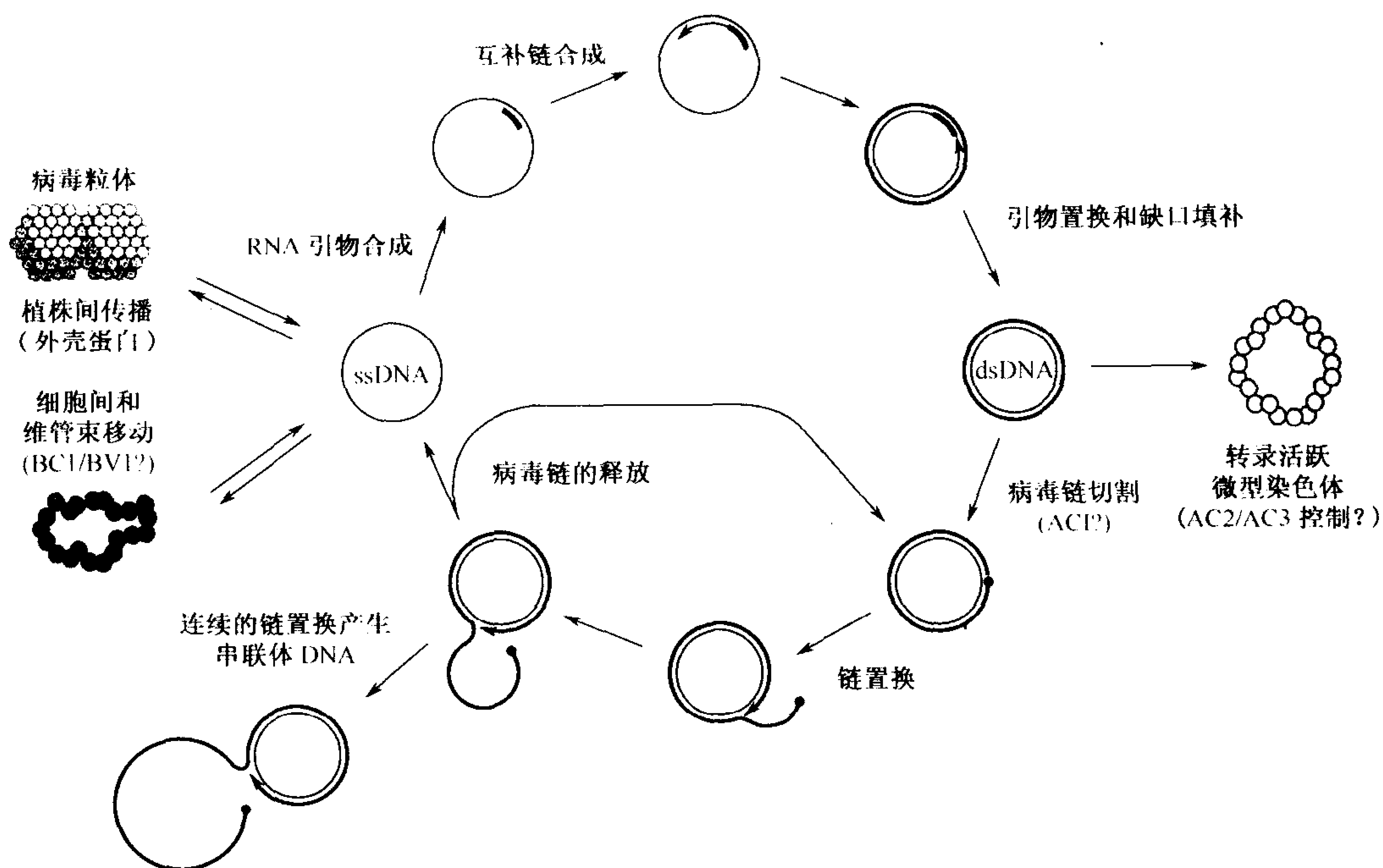


图8.25　双生病毒复制的示意图。承蒙 J. Stanley 提供，谨致谢意。

1988a；Woolston *et al.*，1989)，因此一般认为负链合成是由寄主因子主导的。

2．正链合成

双生病毒正链的体内合成是通过在一个特异性位点的 DNA 切割引发的。以 BCTV、WDV 或 ACMV 的不同株系的异源二聚体侵染植物的子代显示组成的优势基因型依赖于亲本基因组的排列（Stenger *et al.*，1991；Heyraud *et al.*，1993a，b；Stanley，1995)。子代的序列与通过在 5′基因间隔区保守发夹序列内起始或终止的滚环复制所合成的正链 DNA 一致（这一共同区的细节见第 6 章第Ⅴ节 A.2)。起始位点已被定位于保守的九核苷酸序列，TAATATT↓AC，处于发夹结构的环上（Stanley，1995)。双生病毒的 Rep 蛋白是位点特异性内切核酸酶，于体外在相同位点切割并连接病毒的正链 DNA（Laufs *et al.*，1995；Orozco and Hanley Bowdoin，1996)。

正链 DNA 复制起点的分子结构有两大类。玉米线条病毒属病毒的复制起点由一个大的与 Rep 蛋白形成多重复合体的顺式作用区域组成 Castellano *et al.*，1999)；而菜豆金色花叶病毒属病毒含有一个 Rep 蛋白结合位点（Fontes *et al.*，1992，1994b；Lazarowitz *et al.*，1992；Orozco and Hanley-Bowdoin，1998)。

3．正链合成的起点

TGMV 正链合成起始点已经被详细地研究（Hanley Bowdoin *et al.*，1999)，而且已经与其他菜豆金色花叶病毒属病毒和曲顶病毒属病毒的起始点进行了比较。TGMV 正链起始点特征在图 8.26 中给予说明。起始点在共同区域（common region）的左侧而

且和 AC61（也称 AL61）的启动子相重叠（参见第 7 章第Ⅳ节 E.1）。在这一区域内已经鉴定了 6 个顺式元件。

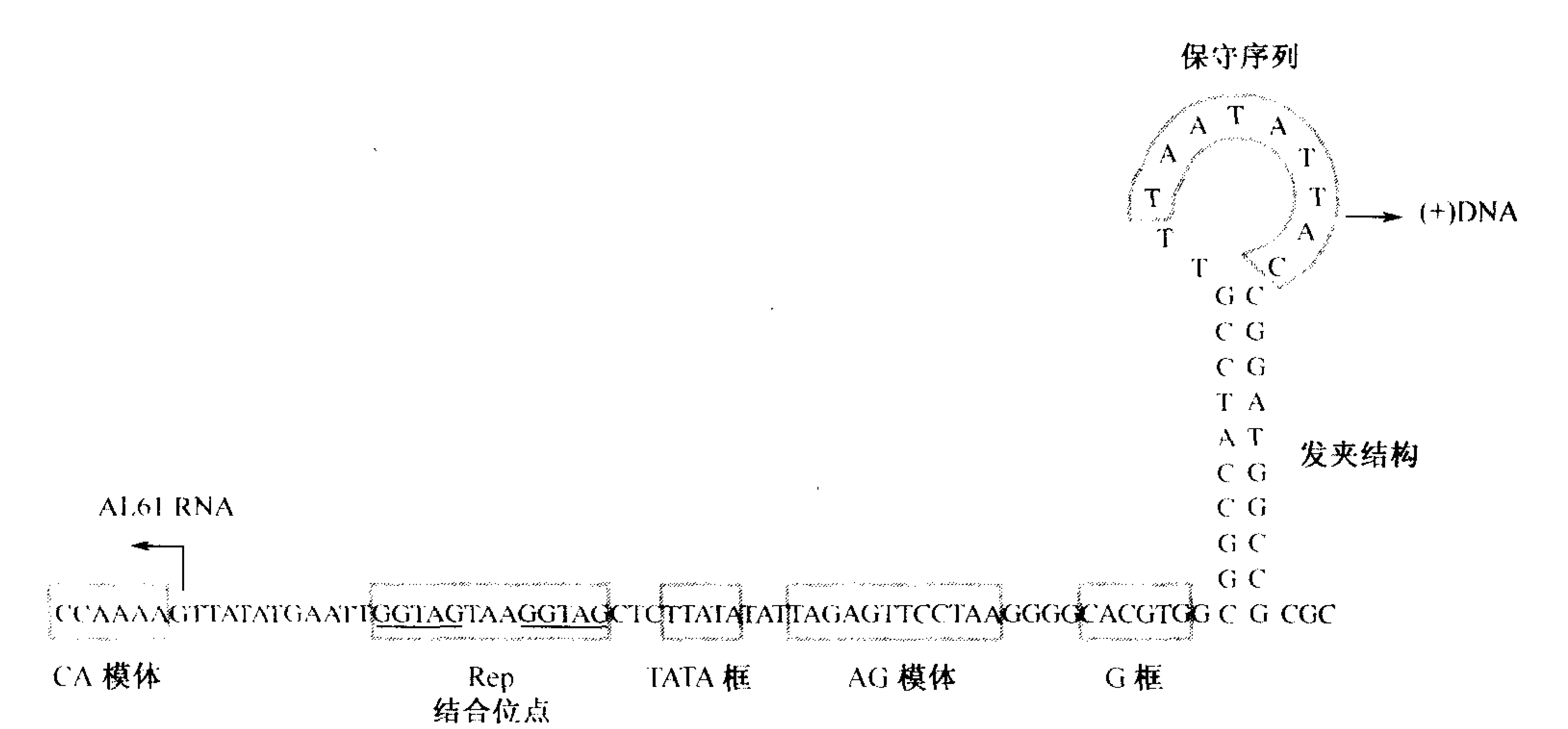


图8.26 TGMV 正链的复制起点和 AC61（AL61）的启动子。展示了与 TGMV A 的第54～153位核苷酸相对应的 DNA 序列。只标出了双链 DNA 复制型的上位链，以及正链复制的起始位点与合成方向以及 AC61转录。其他功能性元件以框表示。该图显示出了发夹结构以及保守的九核苷酸环（nonanucleotide loop）序列（原图此处有误，已改正——译者）。承蒙版权所有者（© CRC Press LLC）惠允，引自 Hanley-Bowdoin 等（1999）。

（1）发夹元件对所有的双生病毒基因组是共同的（Arguello-Astorga *et al.*，1994b）。这包含一个富含 GC 的茎和一个富含 AT 的环，而且诱变分析证明，茎的结构而非序列对于它的活性是不可缺少的。玉米线条病毒属病毒的茎比另外两个属成员的要长很多。5′-TAATATTAC 环在所有的双生病毒中都保守，并且存在于滚环复制的其他核酸的正链起始点。环序列具有一定的序列灵活度，但是切口一定在 TT↓AC 之间。

（2）Rep 结合位点具有一些特征：①它是病毒特异性的（表 8.5），但具有一些保守序列；②GGAT 重复是绝对需要的；③在重复之间的间隔很重要；④结合位点和切口之间的间隔也很重要。对玉米线条病毒属病毒的 Rep 如何识别它们的起始点所知甚少。目前还没有发现和上述的结合位点相似的序列，而且玉米线条病毒属病毒和其他两属相比不具有同样程度的特异性。一般认为玉米线条病毒属病毒 Rep 蛋白和发夹结构茎部的重复序列结合（Arguello-Astorga *et al.*，1994b），但是 WDV 的 Rep/DNA 复合物的电镜检查显示结合位点和另外两属的位点相似（Sanz-Burgos and Gutierrez，1998）。

表 8.5 Rep 蛋白的结合位点

番茄金色花叶病毒（TGMV）	GGTAGTAA-GGTAG
菜豆金色花叶病毒（BGMV）	GG-AG-ACTGG-AG
苘麻花叶病毒（AbMV）	GG-AGTATTGG-AG
共有序列	GG-AGTAYYGG-AG

（3）菜豆金色花叶病毒属病毒和曲顶病毒属病毒正链起始点都具有 TATA 框和 G

框两个转录因子的结合位点（图 8.26）。病毒复制不需要寄主转录因子结合位点。

（4）其他两个元件是 AG 模体和 CA 模体（图 8.26）。AG 模体对病毒复制是必需的（Orozco *et al.*，1998），但还没发现对 AC61 的转录起什么作用。CA 的缺失使得 TGMV 复制约减少为原来的 1/20，诱变证明它是一个效率元件（efficiency element）。

虽然这些元件起作用的机制还没有确定，一般认为它可能与复制所需的植物因子相结合（Hanley-Bowdoin *et al.*，1999）。

4. 双生病毒的 Rep 蛋白

Rep 蛋白是复制所需要的唯一病毒蛋白（Elmer *et al.*，1988a；Schalk *et al.*，1989）。在菜豆金色花叶病毒属病毒和曲顶病毒属病毒中，Rep 由 ORF C1 编码，而在玉米线条病毒属病毒中它由 ORF C1：ORF C2 通过剪接的 mRNA 翻译产生，非剪接的 RNA 由 ORF C1 产生 RepA。

Rep 和 RepA 是多功能蛋白：

（1）它们定位在核内（Nagar *et al.*，1995）。

（2）具有特异的 DNA 识别位点（Fontes *et al.*，1994a）。

（3）它们具有正链病毒 DNA 的位点特异性的内切核酸酶活性和连接酶活性（见上文）。

（4）它们有 ATP/GTP 酶活性（Desbiez *et al.*，1995）。

（5）一些玉米线条病毒属病毒和菜豆金色花叶病毒属病毒的 Rep 和 RepA 已被证明具有激活外壳蛋白基因 mRNA 启动子的能力（Hayley *et al.*，1992；Hofer *et al.*，1992；Sunter and Bisaro1991；Zhan *et al.*，1993）。

（6）菜豆金色花叶病毒属的 Rep 能抑制自己的启动子（Hong and Stanley，1995；Sunter *et al.*，1993）。

（7）菜豆金色花叶病毒属的 Rep 能刺激增殖细胞核抗原 PCNA 的表达（Nagar *et al.*，1995）。

（8）它们可与类成视网膜细胞瘤蛋白相互作用（见下文）。

TGMV 的 Rep 蛋白结构域已经确定（Hanley-Bowdoin，1999）[图 8.27（A）]。其他的菜豆金色花叶病毒属和曲顶病毒属 Rep 蛋白很可能具有相似的结构 [图 8.27（B）]。虽然玉米线条病毒属的 Rep 不同于其他属的，但是它们确实有一些共同模体，而且它们很可能具有类似的结构域。

Rep 蛋白具有一些蛋白质-蛋白质互作。首先，Rep 蛋白以一种非病毒特异的方式由约 8 个亚基构成一个低聚体（Orozco *et al.*，1997）。一般认为，Rep 的 DNA 结合活性依赖于这种多聚化（Orozco and Hanley-Bowdoin，1998）。MSV 的 Rep 二聚体化，因为单体只有一个用于切割的活性酪氨酸，二聚体中额外的酪氨酸可有效地用于第二个切割或结合反应（Horváth *et al.*，1998）。在 WDV 的 Rep 和 RepA 研究中使用 DNA 酶足迹法和化学交联技术，Missich 等（2000）证明这些复制蛋白质在病毒链和互补链的启动子 TATA 框附近形成大的核蛋白复合物。两个蛋白质的低聚体化依赖于 pH，八聚体形成于 pH7.0，而在 pH7.4 时主要形态是单体。预先形成的寡聚体和 DNA 几乎没有互相作用。作者认为存在一种蛋白质-DNA 复合体的分步装配，即单体和 DNA

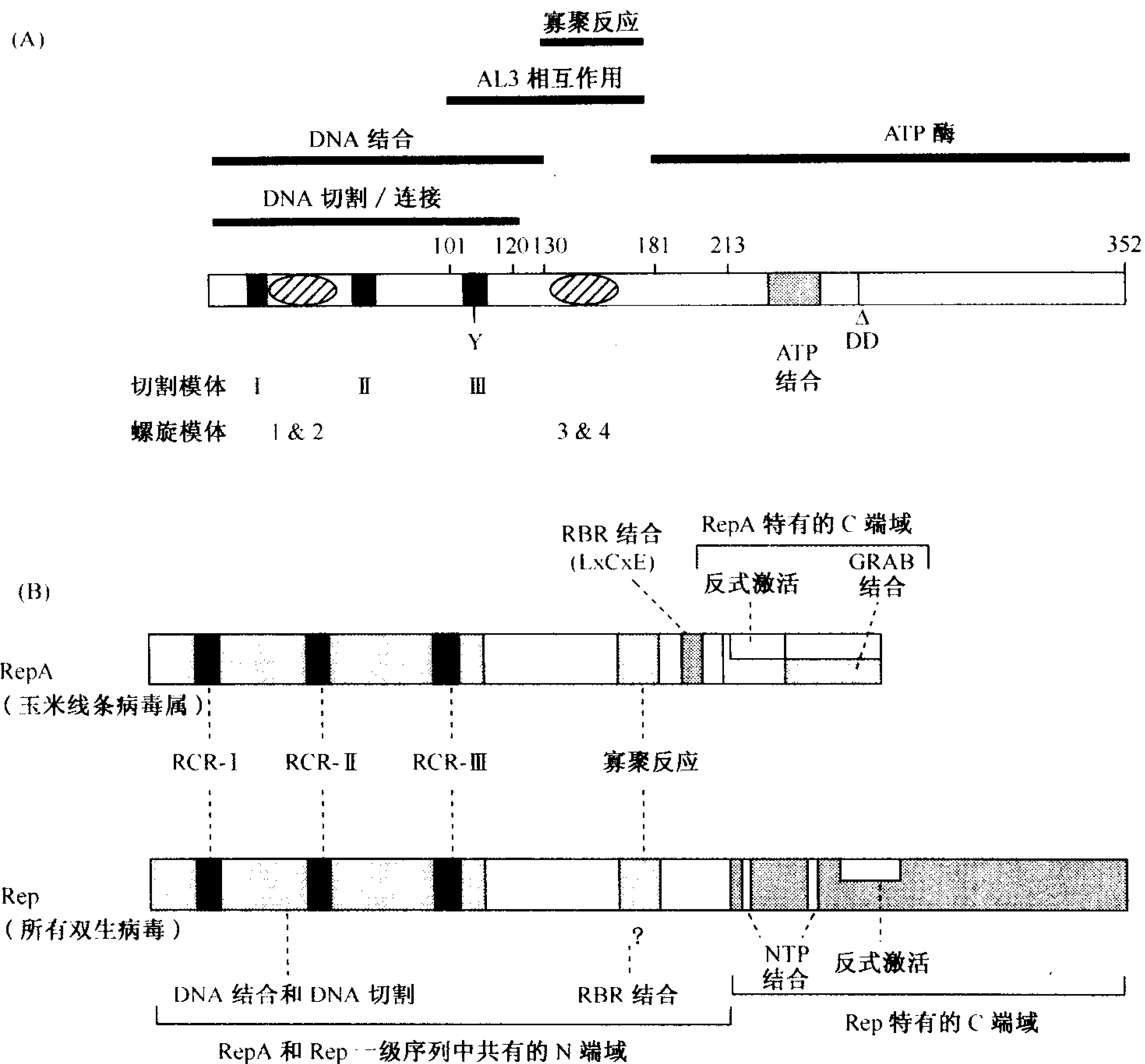


图8.27 Rep 和 RepA 蛋白的结构域结构。(A)TGMV Rep 结构域和推测的模体。实心框标注了 Rep 蛋白中3个保守的 DNA 切割模体的位置。活性部位酪氨酸残基显示在模体Ⅲ中。斑点框表示和 DNA 解旋酶相关的 ATP 结合模体位置，该位置结合保守的天冬氨酸残基。阴影线圈指示了一组推测的 α 螺旋。螺旋2具有很强的两性分子特点。蛋白质上面的实线标出了低聚合作用(oligomerization)的功能性结构域，AC3（AL3）交互作用、DNA 结合和 DNA 切割/结合的位置。(B)玉米线条病毒属病毒 RepA 和所有双生病毒 Rep 结构的比较示意图。不同的结构域对应于基于来自不同双生病毒的可利用的数据复合而成的组合体，因此每一个结构域的位置是大致的。RCR-Ⅰ、RCR-Ⅱ和 RCR-Ⅲ 是提到的参与滚环复制蛋白质上保守的氨基酸模体。承蒙版权所有者(© CRC Press LLC)惠允，(A)引自 Hanley-Bowdoin 等(1999)；承蒙版权所有者(© Kluwer Academic Publishers)惠允，(B)引自 Gutierrez (2000b)。

互作，然后复合体与其他单体互作装配成寡聚体结构。

其次，Rep 和（A）C3 蛋白结合。（A）C3 蛋白定位于细胞核内并提高菜豆金色花叶病毒属和曲顶病毒属病毒的 DNA 积累。一般认为这种提高是通过和 Rep 结合造成的（Hanley-Bowdoin *et al.*，1999）。

第三，Rep 与来自植物和动物的成视网膜细胞瘤因子相结合（见下文）。

最后，RepA 和 GRAB 蛋白（双生病毒 RepA 结合蛋白）结合（Xie *et al.*，1999）。用 WDV RepA 蛋白在酵母双杂交系统中作钓饵，将 GRAB 蛋白质家族从小麦悬浮培养细胞中分离出来。在 RepA C 端的 37 个氨基酸，在其他的玉米线条病毒属病毒之中也

同样保守的一段区域，可与 GRAB 蛋白的 N 端区域相互作用。小麦细胞中 GRAB1 和 GRAB2 蛋白的表达抑制 WDV 的复制。GRAB 蛋白与植物发育和衰老相关的蛋白质的 NAC 结构域有显著的氨基酸同源性。

5. 双生病毒的细胞周期调控（Gutierrez，2000b）

如上所述，双生病毒在寄主 DNA 复制已经终止的分化的植物细胞中复制。病毒的复制依赖于寄主 DNA 复制因子，因此细胞周期需要改变。一系列证据表明 Rep 蛋白参与这一改变过程（Hanley-Bowdoin，1999）。在转基因植物中，许多 Rep 蛋白不服从稳定性的组成型表达。在表达确实发生的植株和被 TGMV 侵染的植株中，细胞核变圆并向细胞中心移动，这些特征与脱分化相关。Rep 蛋白（或玉米线条病毒属病毒的 RepA）与包括植物等多种来源的成视网膜细胞瘤（Rb）蛋白结合（Horváth *et al.*，1998；Liu *et al.*，1999）。

动物的 Rb 蛋白很可能通过控制细胞周期的 G_0/G_1 期进入 S 期的转变来调节细胞生长（Gutierrez，1998；de Jager and Murray，1999）。一般认为，Rb 蛋白的植物类似物（analog）具有类似的功能。各种不同的动物病毒 DNA，利用 Rb 蛋白与病毒编码的一种蛋白质通过 LXCXE 模体结合，来控制它们的寄主的细胞周期（Hanley-Bowdoin *et al.*，1999；Gutierrez，2000）。曲顶病毒属和菜豆金色花叶病毒属病毒的 Rep 蛋白与玉米线条病毒属病毒的 RepA/Rep 蛋白一样，具有一个 LXCXE 模体。但是，CSMV 却没有 LXCXE 模体（Horváth *et al.*，1998）。尽管在 BeYDV 中的模体突变降低了 Rep 的结合能力，但是它没有完全终止病毒的复制（Liu *et al.*，1999）。如上所述，菜豆金色花叶病毒属和曲顶病毒属的 Rep 蛋白和玉米线条病毒属的 RepA 蛋白结合不同来源的 Rb 蛋白，而且很有可能这种结合方式与动物病毒蛋白和寄主 Rb 蛋白的结合方式相似。因此，这表明结合作用可抑制 Rb 蛋白对寄主细胞维持在细胞周期 G 期的控制，并使其回到 S 期以产生病毒复制所需的各种因子。但前提条件是 Rep 必须从侵入的病毒上表达出来。因此，一定要有充足的能力使新侵染的细胞中起始负链合成以产生双链 DNA，用于 mRNA 转录以翻译 Rep。此起始事件的细节尚未确定，但在图 8.28 中展示了一个模型。

E. 矮缩病毒科病毒的复制

如第 6 章（第Ⅴ节 B.1）中所述，矮缩病毒科病毒的基因组至少有 6 种小的环状单链 DNA，每个都有单一的 ORF。虽然它们并不像双生病毒一样被很详细地研究过，但是矮缩病毒科属病毒和双生病毒具有一些共同的特征，这暗示着它们的复制机制应该很相似。

每一种矮缩病毒 DNA 具有一个被预测是形成茎-环结构的共有的区域，该环包含一个九核苷酸序列 5′-TAT/GTATTAC-3′，也存在于双生病毒正链合成的起始点（Burns *et al.*，1995）。

至少一种 DNA 组分从其序列推断出可编码一个 Rep 蛋白（表 6.1）（Harding *et al.*，1993；Wu *et al.*，1994；Sano *et al.*，1998；Timchenko *et al.*，1999）。大肠杆菌表达蛋白质的体外测试表明，BBTV 的 Rep 蛋白具有位点特异性切割和连接活性

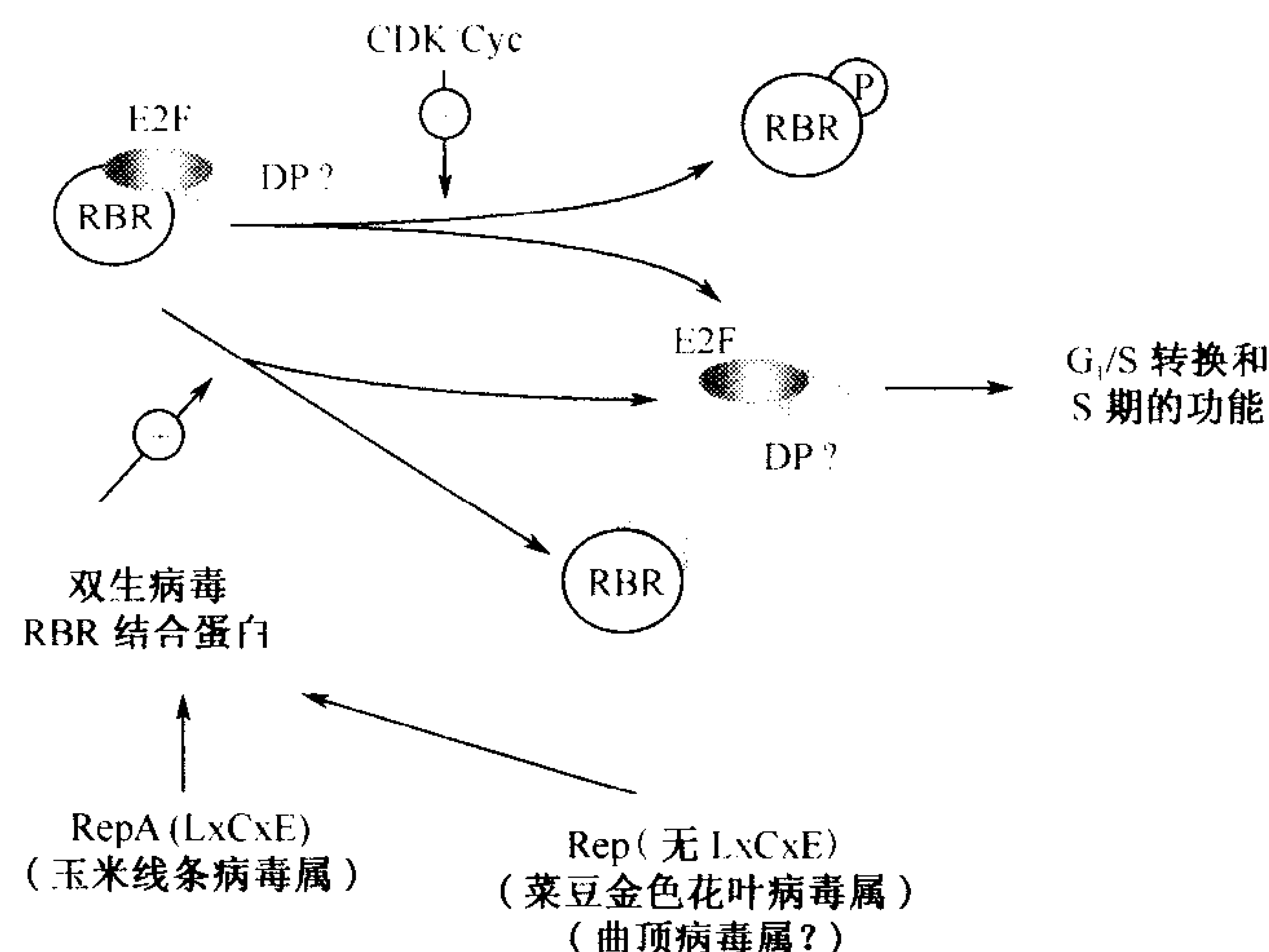


图8.28 双生病毒可能用来干扰成视网膜细胞瘤相关的(RBR)/E2F途径的两个机制的模型。G_1/S期转换通常被CDK/细胞周期蛋白复合体通过RBR磷酸化调控。RBR磷酸化释放G_1/S转换和S期功能必需的RBR结合的E2F转录因子(标记的问号表示DP样蛋白质还没有在植物中鉴定)。双生病毒蛋白(玉米线条病毒属的RepA和菜豆金色花叶病毒属的Rep)被认为可结合RBR并且释放RBR结合因子,从而绕过正常的细胞调控。玉米线条病毒属RepA蛋白通过它的LxCxE与RBR相互作用,而菜豆金色花叶病毒属并且很可能还有曲顶病毒属的Rep通过不同的模体实现此互作。承蒙版权所有者(Kluwer Academic Publishers)惠允,引自Gutierrez (2006)。

(Hafner *et al.*, 1997a)。就FBNYV而言,10种其基因组DNA片段中的5种可能编码Rep蛋白(Timchenko *et al.* 1999)。来自DNA 1、DNA 2的基因产物(Rep1、Rep2)在体外具有位点特异性DNA切割和核苷酸转移活性而且催化这些反应必需的酪氨酸残基已经通过诱变得到鉴定。Rep 1、Rep 2蛋白可以水解ATP,而且这一活性对病毒DNA的增殖是必要的。5个Rep蛋白中的每一种都起始编码它的DNA的复制,但是只有Rep 2可以起始6个DNA中的任意一个复制,即使它不编码该蛋白质。因此,只有一个Rep是主要Rep,而且能够启动异源的矮缩病毒DNA的复制(Timchenko *et al.*, 2000)。

矮缩病毒同双生病毒面临同样的问题,即它们需要在转录不活跃的细胞内开始复制其DNA。SCSV的DNA能够自动引发负链的合成(Chu and Helms, 1998)。利用依赖于DNA的DNA聚合酶进行自动引发延伸,Hafner等(1997b)证明BBTV的6个DNA含有结合到基因组DNA上的内源性的引物。这些引物的大小不同,并可能源于DNA 5,而且相对于其他DNA来讲,该DNA自动引发更有效。据认为DNA 5编码的蛋白质的功能在侵染过程的早期具有很重要的作用。

BBTV DNA 5编码产物具有前面提到的成视网膜细胞瘤(RB)结合蛋白的特征性LxCxE模体(参见第Ⅷ节D.5)(Wanitchakorn *et al.*, 2000)。酵母双杂交系统证明,这一蛋白质具有RB结合活性而且其活性依赖于LxCxE模体。FBNYV的5种Rep蛋白均不包含LxCxE模体。然而,由DNA 10编码的20 kDa蛋白质确实含有这一个模体,而且有一个与结合遍(在)蛋白连接酶(植物的SKP1同源物)有关的F框

(Aronson *et al.*, 2000)。DNA 10 编码的该蛋白质，称为 Clink（细胞周期连接物，cell cycle link），可与 RB 结合并激活病毒复制；上面提到的 BBTV DNA 5 的产物是 Clink 的同源物。然而，Clink 对于侵染本生烟并不是必需的，因此，这个病毒很有可能编码一种或多种细胞周期调节（活性）蛋白。从 Clink 和遍蛋白的-蛋白质周转途径的一个组分相伴随来看，它可能不仅阻断 RB 蛋白质的作用，还与此蛋白质结合以进行加工。

第Ⅸ节 突变和重组

复制中出现错误的两个主要途径是突变和重组。在本节中，将讨论导致这些错误的机制，而且在第 17 章中，将会讨论复制中的这些错误对植物病毒的变异和进化的影响。重组也与各种不同的其他病毒现象相关，也将在这里描述。

A. 突变（Domingo and Holland，1997；Drake *et al.*，1998）。

复制突变包括碱基置换、碱基插入和碱基缺失。在讨论突变时，必须区分突变频率（mutation frequency）和突变率（mutation rate）（Domingo，1999）。突变频率是一个基因组群体中突变体（是整个序列或某一具体的特殊位点的平均值）所占的比例。突变率是基因组复制期间一个突变事件的发生频度。在这里我们将会讨论突变率，但是突变频率在变异和进化的分析中非常重要。

突变的比率取决于复制类型、前后核酸序列和环境因素。如图 8.29 所示，核酸复制 DNA→DNA 和其他复制途径比较有较低的突变率。这是因为依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶具有校正能力检查是否是正确的核苷酸被加入，而其他的聚合酶没有这一能力（依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶、RdRp 和 RT）(Steinhauer *et al.*，1992)。RNA 复制酶和 RT 的晶体结构展现缺乏依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶存在的由 5′→3′外切核酸校正的结构域（Hansen *et al.*，1997；Joyce and Steitz，1994；Kohlstaedt *et al.*，1992）。

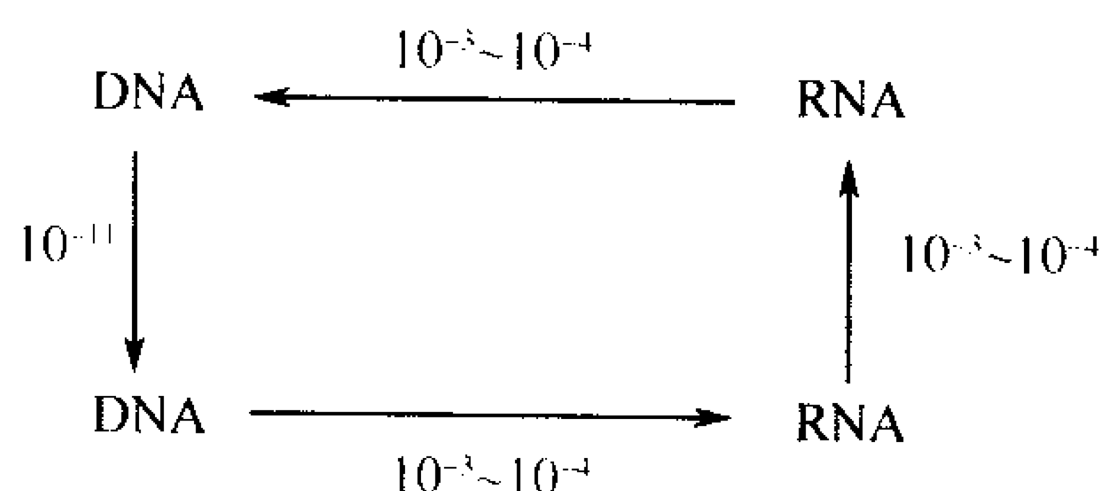


图8.29 在 DNA 或 RNA 之内和它们之间的复制与转录错误率。

对错误率的研究大部分是在体外进行的，而且已经表明核苷三磷酸底物的相对浓度和培养基离子的成分等参数具有显著的影响（Domingo and Holland，1997）。同样地，体外研究表明被复制部分的前后序列可以对一些区域的超突变造成影响。几乎没有证据可以判断这些影响因素在体内对植物病毒的重要性。试图将选择压力尽量减少，Kearney 等（1993）测定了克隆到 TMV 载体中的两个外源序列（二氢还原酶和新霉素磷酸转移酶Ⅱ）的漂移（drift）。一般认为，这些外源序列不会受到病毒序列选择限制的影响，并且明确了在本生烟中每转接一代每个碱基积累的突变比率≤10^{-4}。

B. 重组（Bujarski，1999；Hammond *et al.*，1999）

重组是指由来自不同的亲本分子或相同分子上的不同位置上的片段所形成的嵌合核酸分子。它通常但不总是在复制期间发生，并且可以成为一种对由突变所致异常结果的

修复机制。这也是将会在第 17 章中讨论的变异的一个主要来源。

在关于重组的许多实验中，重组的设计就是要利用重组来恢复在两个核酸之间失去或耗损的功能。在这一方法中，存在对重组事件的强选择可能会扭曲重组频度的测量结果。如果是在减少或者没有选择的条件下完成的实验，则会给出与“自然”情形更真实的描述。因此，尽管认识到重组率尤其是 RNA 的重组率很高，但对“自然”情况下实际发生值估计还很少。

DNA 和 RNA 病毒之间在重组的机制方面存在许多相似点和不同点。

1. DNA 病毒的重组

DNA 病毒重组有两种基本形式：

（1）同源重组发生于两个相同或相似的 DNA 序列的交换点上。

（2）异源重组（non-homologous recombination）或非常规重组（illegitimate recombination）发生于有微同源性（microhomology）或没有明显同源性的位点上。

后者通常发生于双链断裂的修复过程中（Sargent *et al.*，1997）。在动物和细菌病毒中，异源重组是很罕见的事件而且通常由病毒或寄主编码的蛋白质作为媒介。同源重组可能需要特殊的寄主或病毒蛋白，但也可能是由于模板在复制期间转变所致。

重组在双生病毒中很普遍，并且是这一病毒科进化的主要动力（Padidam *et al.*，1999）（参见第 17 章第Ⅹ节 D.7）。一些早期证据来自 ACMV DNA 2 ORF 的插入或缺失突变体，突变体的侵染性被破坏，但共同接种包含在不同 ORF 上单一突变的构建物可以恢复侵染性（Etessami *et al.*，1988）。频繁发生的分子间重组产生了占优势的亲本型病毒。克隆的 TGMV DNA 两个组分的串联二聚体侵染本生烟产生了两个组分的基因组长度单链 DNA 分子（Hayes *et al.*，1988a）。没有证据表明是分子间重组或一些复制事件导致了产生这些单位大小的 DNA。在 ACMV 保守的茎-环结构中致命的突变会快速地通过重组得以修正（Roberts and Stanley，1994）。

在双生病毒的种间和种内都发现了重组现象。用农杆菌接种到植物上的串联的构建物经过复制释放出单位长度的基因组（Stenger *et al.*，1991），据推测是由于同源重组所致。很难区别种间重组是同源的还是非同源的。在棉花中发现的菜豆金色花叶病毒属病毒明显的重组位点靠近正链合成的起点（Sanz *et al.*，2000）。由于正链合成起点的序列在病毒种间保守，交叉重组可归因于同源序列。另一方面，也存在发生非同源重组强有力的证据，包括缺失突变体到野生型基因组大小的回复突变、双生病毒载体上外源序列的缺失、从两个突变体合成野生型分子、有缺陷的亚基因组分子的合成和从包含单体基因组插入片段的重组质粒中释放有侵染性的病毒 DNA（Bisaro，1994）。

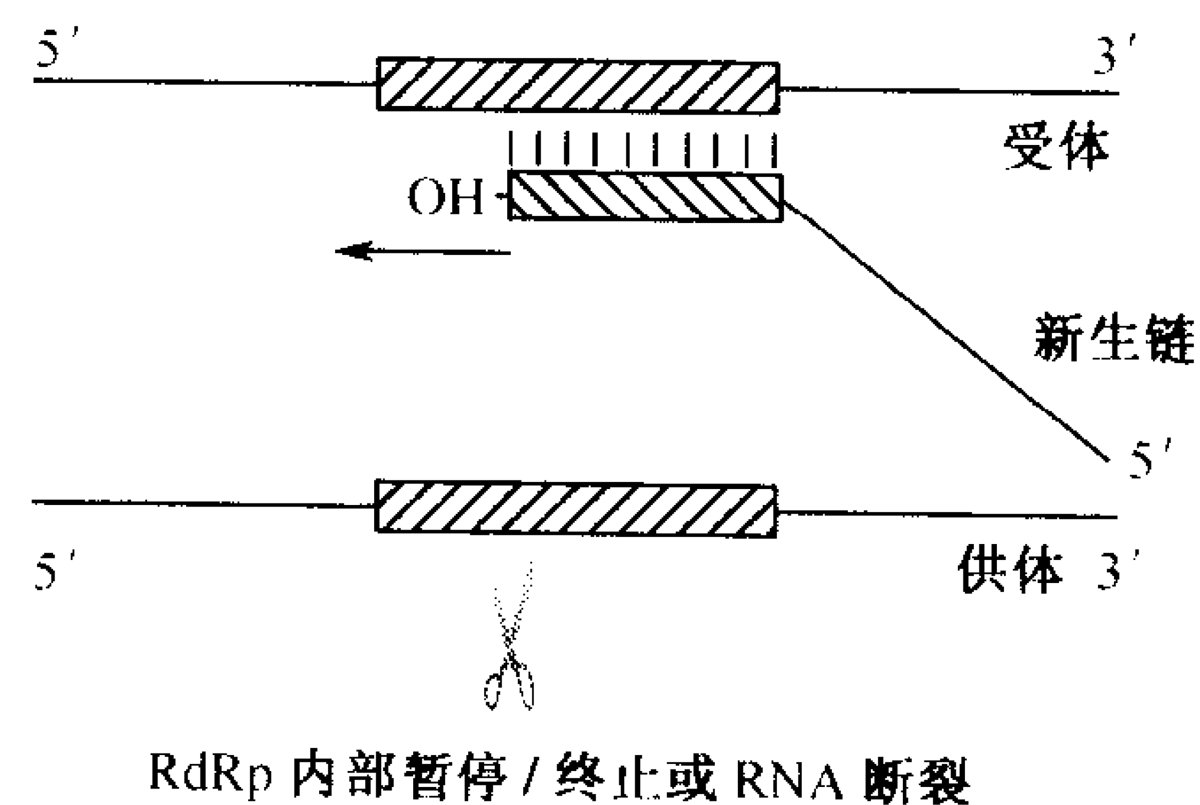
CaMV 重组也很普遍，甚至花椰菜花叶病毒科所有其他的病毒中可能也是如此。CaMV 涉及 DNA 和 RNA 重组，稍后将在第Ⅸ节 B.3 中讨论。

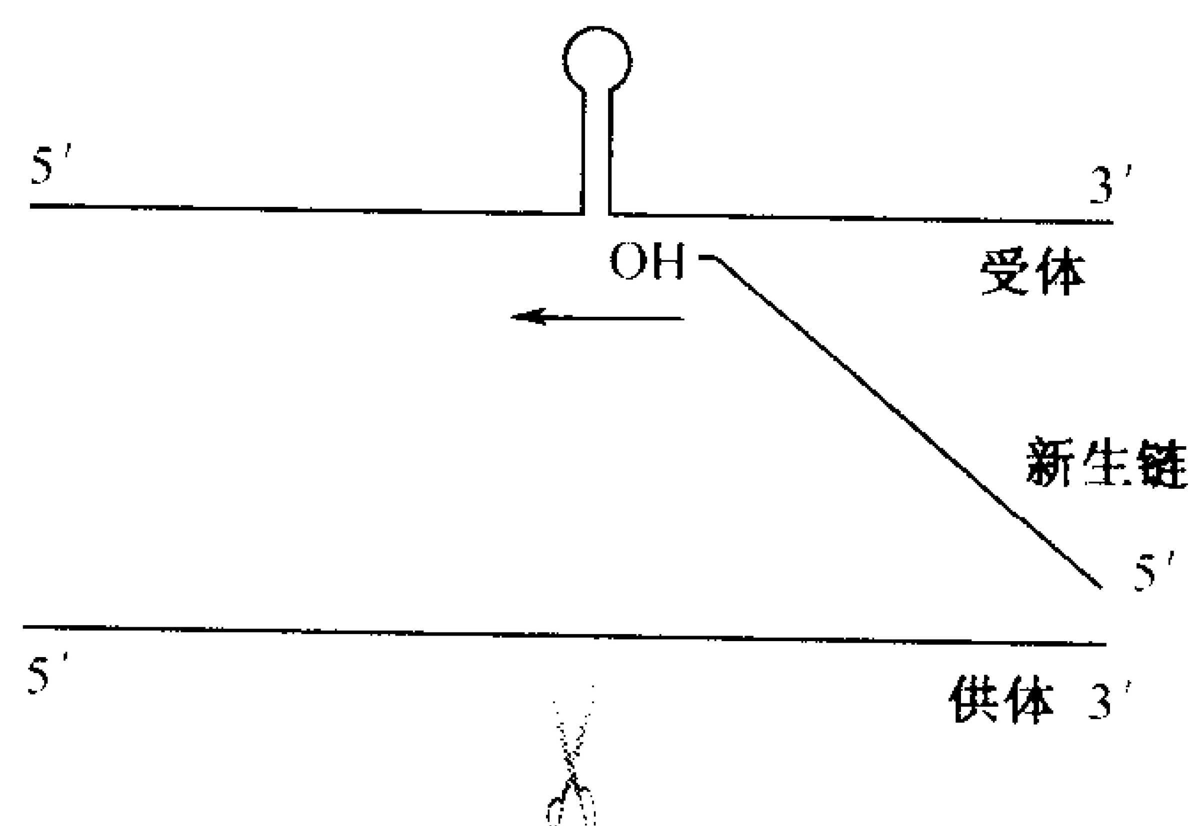
2. RNA 病毒的重组（Lai，1992；Nagy and Simon，1997）

最初将 RNA 重组像 DNA 重组一样分为同源重组和异源重组（non-homologous recombination）（King，1988）。因为同源重组存在变异幅度（range of variation），Lai（1992）又将此类重组分为同源重组和异常同源（aberrant homologous）重组。同源重

组体同亲本分子（parental molecule）相比没有序列的改变，而异常同源重组包含突变，即在插入位点或其附近的缺失或插入。在对 RNA 重组体进一步的分析时，Nagy 和 Simon（1997）又提出了重组的 3 种类型（图 8.30）。

第 1 类重组称为相似性必需的重组（similarity-essential recombination），即在亲本 RNA 之间存在一定程度的序列相似性。产物可能存在两种类型：精确重组体和不精确的重组体（imprecise recombinant），类似 Lai（1992）提出的同源重组和异常同源重组。第 2 类重组为相似性不重要的重组（similarity-nonessential recombination），发生在没有相似区域的亲本之间。一般认为，转酯作用（transesterification）、RdRp 结合部位和二级结构等特征在重组事件中发挥作用（Chetverin，1999）。第 3 类重组为相似性辅助的重组（similarity-assisted recombination）这类重组，结合了第 1 类和第 2 类重组的特征。在这一类型中，亲本 RNA 之间存在类似序列，但是另外的仅存在于双亲 RNA 之一上的 RNA 决定因子对于有效重组是必需的。





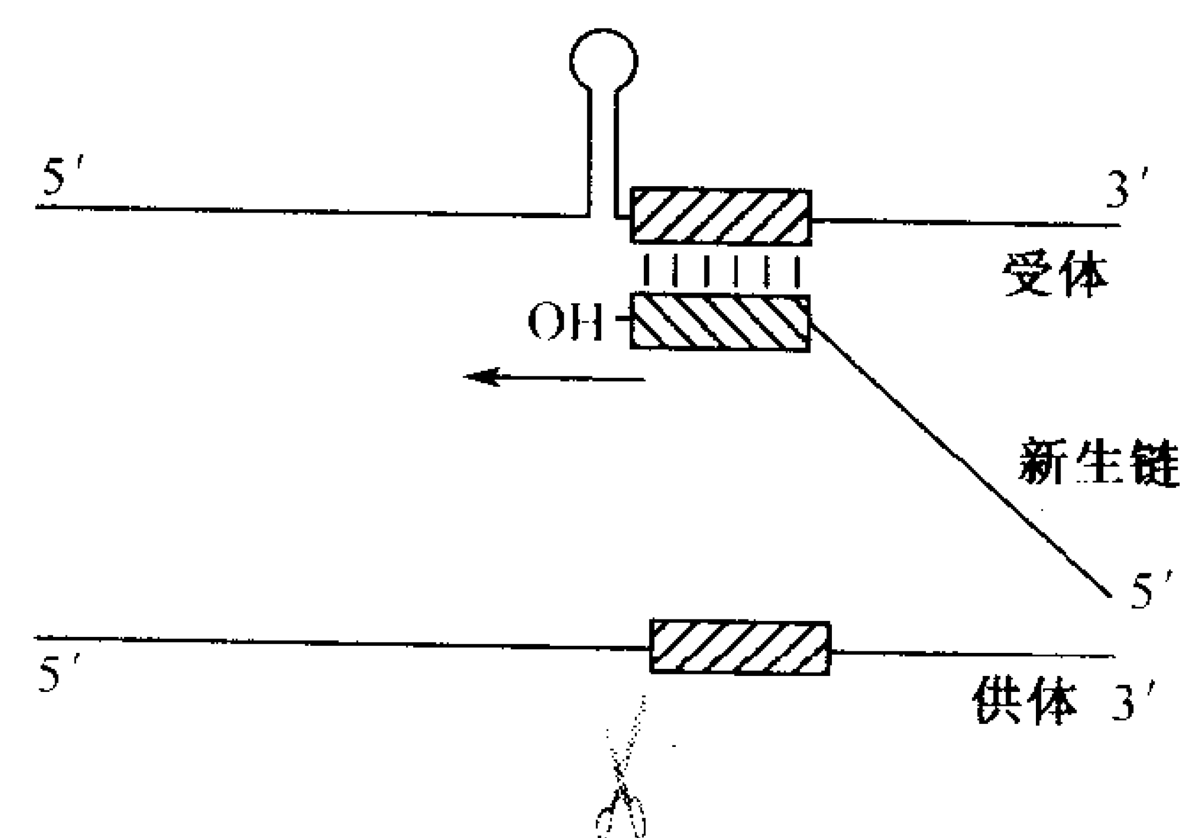


图8.30 RNA 重组的3种类型。发生模板转换（template-switch）后复制酶介导的 RNA 合成用一箭头表示。出现在受体 RNA 上的发夹结构象征性地代表了第2类和第3类重组所需要的不同 RNA 决定子。经允许，引自 Nagy 和 Simon（1997）。

现已提出 RNA 重组的 3 种机制（Nagy and Simon，1997）：①复制酶驱动的模板转换模型（replicase-driven template switching model）；② RNA 断裂-连接模型（RNA breakage and ligation model）；③RNA 断裂诱导的模板转换模型（breakage-induced template switching model）。

复制酶介导模板转换模型包括 4 种元件：3 种 RNA［即初始 RNA 模板（供体链，donor strand）、从起始 RNA 模板合成的链（新生链，nascent strand）和结合新生链的受体链（acceptor strand）］以及复制酶复合体（图 8.31）。在供体链上，新生链的合成暂停或减慢以使 RdRp 或新生链能够与受体链发生互作，导致模板转换（template switching）。因此，在供体链或新生链上存在两种类型的信号：一种信号（暂停或停顿信号，pausing or arrest signal）使 RdRp 暂停，但它可逃脱；另一种信号（终止子信号，terminator signal）能从 RNA 链上释放 RdRp。一般认为，这些信号可能与由依赖于 DNA

的 DNA 聚合酶和 RT 行使的模板转换所涉及的信号相似，且与供体链或新生链 RNA 的二级结构和（或）序列相关。这些促进 RdRp 暂停或终止的区域将会构成重组热点（recombination hotspot）。为进行模板转换，RdRp 必须能够结合受体 RNA，并且使用新生链 RNA 的 3′端作为一个引物来重新起始 RNA 合成。

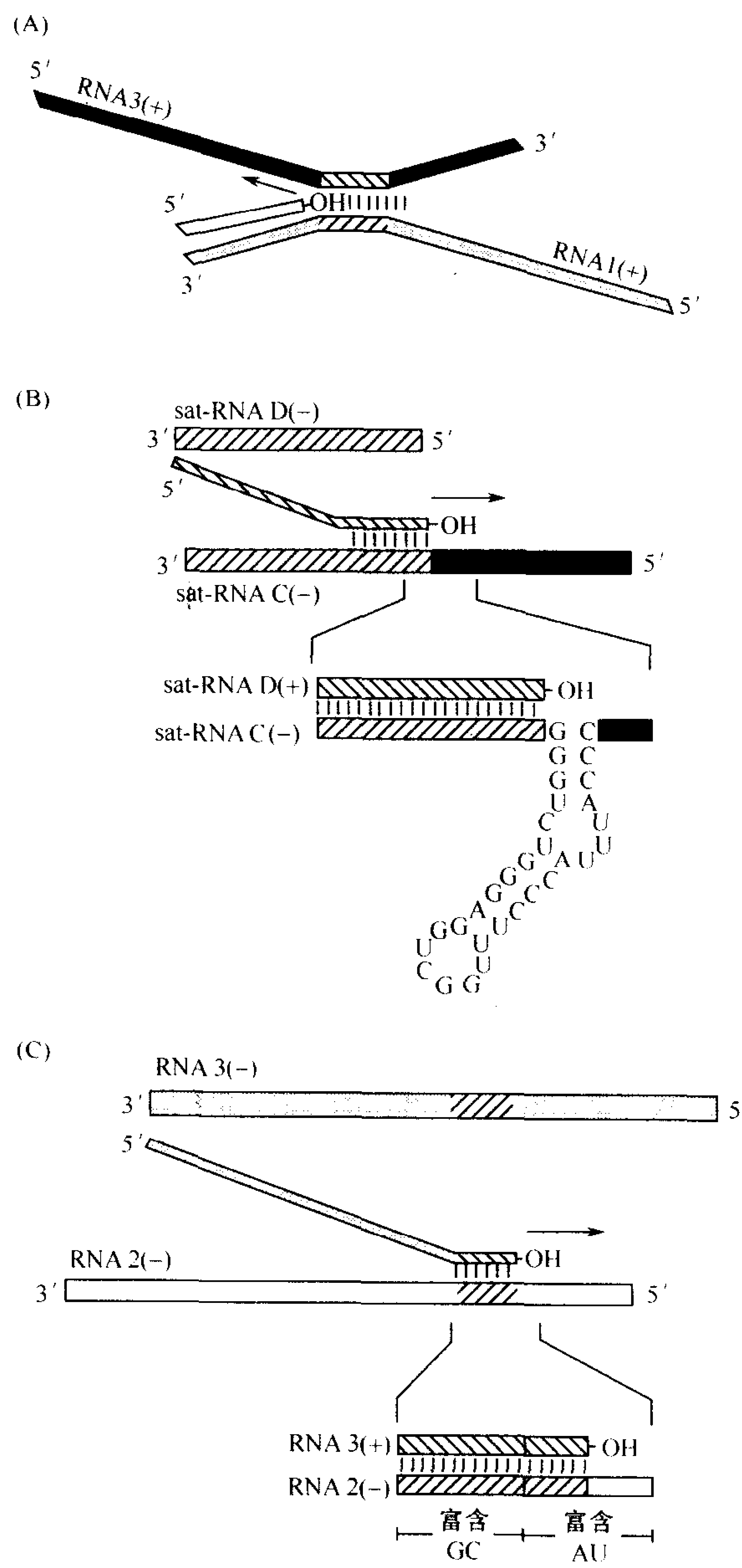


图8.31　TCV 和 BMV RNA 重组的复制酶介导的模板转换模型。(A)异源双链分子介导的 BMV RNA 1和 RNA 3的正链间的重组。(B) 在伴随 TCV 的卫星 RNA 间的重组。此处标出了必需模体1-发夹结构。(C) 发生在 BMV RNA 2和 RNA 3相同区域内的重组事件。当富含 GC 和富含 AU 的序列存在于所示的位置时利于重组。经允许，引自 Nagy 和 Simon(1997)。

尽管存在几种模型，但对于 RdRp 引起的模板转换的真实机制还知之甚少。在持续性的模型中，认为 RdRp 接近异双螺旋链区域时暂停，其或者转向到受体序列或者退滑 10～20 个核苷酸使新生链与受体链杂交结合。在非持续性的模型中，认为 RdRp 从供体链分离后再与新生链和受体链结合。

RNA 断裂-连接模型与特性清楚的 DNA 断裂和连接系统相似。但该 RNA 重组模型还没有得到证实。

RNA 断裂诱导的模板转换模型与复制酶驱动的模板转换模型类似，只是需要通过复制酶在模板 RNA 的断裂处暂停所诱导的模板转换。由于 RNA 的不稳定性，因此要区分这一个模型和复制酶介导的模板转换模型可能很困难。

一般认为，大多数 RNA 病毒都会发生重组。重组的证据为嵌合分子（chimeric molecule）、缺损性（defective，D）分子和缺损干扰性（defective interfering，DI）分子的存在。然而，可能所有病毒均以相似的速率发生重组，而较高的速率反映出重组成功的机会较大。一些病毒的重组速率明显高于其他病毒，这已成为详细研究的主题。下面将论述两个病毒系统：雀麦花叶病毒属病毒（bromoviruses）和芜菁皱缩病毒（TCV）。它们的嵌合分子和 D 分子的形成已经被广泛地研究，并由此提供了许多理论性的信息；然后讨论在病害表达中可能比较重要的 DI 分子。

a. 雀麦花叶病毒属病毒的重组（Bujarski and Nagy，1996）

植物 RNA 病毒的重组首先被有关 BMV 的一个实验所证实，即在其 RNA 3 的 3′端保守的类 tRNA 结构中的短小缺失可利用 RNA 1 或 RNA 2 的 3′端通过在植株中的重组事件得到修复（Bujarski and Kaesberg，1986）。自此以后，对 BMV 的同源重组（homologous recombination）和异源重组（non-homologous recombination）均进行了更为详细的研究。

通过测定衍生自 BMV 的不同序列之间的同源重组行为，Nagy 等（1999）鉴定出了能影响重组的 5 个特征（当都存在时称为同源性重组激活子）。

（1）供体和受体 RNA 之间的共同区域（common region）的同源序列的长度需要 15 个或更多的核苷酸以达到有效的同源交换（homologous crossover）（Nagy and Bujarski，1995）；

（2）序列同一性（sequence identity）的程度很重要（Nagy and Bujarski，1995）；

（3）共同区域的 AU 含量为 61%～65%，AU 支持频繁的同源重组（Nagy and Bujarski，1997；Nagy *et al.*，1999）；

（4）富含 AU 区域（Nagy and Bujarski，1997）的相对位置；

（5）当受体 RNA 上存在富 GC 序列时，对上游热点区域有抑制作用（Nagy and Bujarsky，1998）。

因此，重组热点具有富含 GC 的共同区域，后面跟随一个富含 AU 的区域。一般认为，富含 AU 的区域引起复制酶暂停并促进 RdRp 的滑移（slippage），引起非模板核苷酸的掺入（incorporation）；非模板核苷酸存在于 BMV 的重组体中（Nagy and Bujarski，1993；1996）。该同源重组的模型见图 8.32 中的说明。

BMV 的异源重组的发生频率为同源重组的 10%。Nagy 和 Bujarsky（1993）建立了一个 BMV 重组载体系统用于探究异源重组。在这些及后来的实验中（Bujarski and

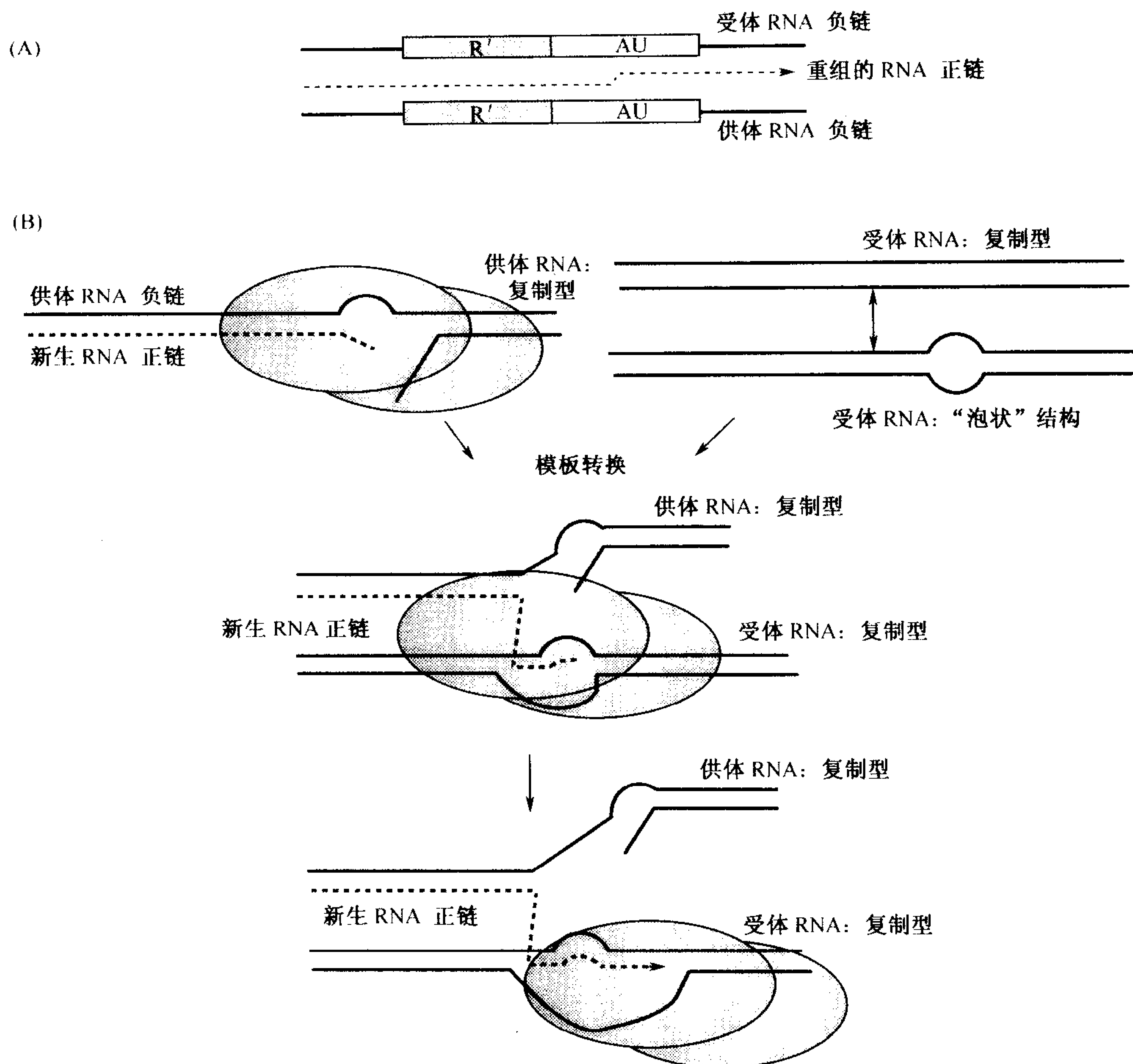
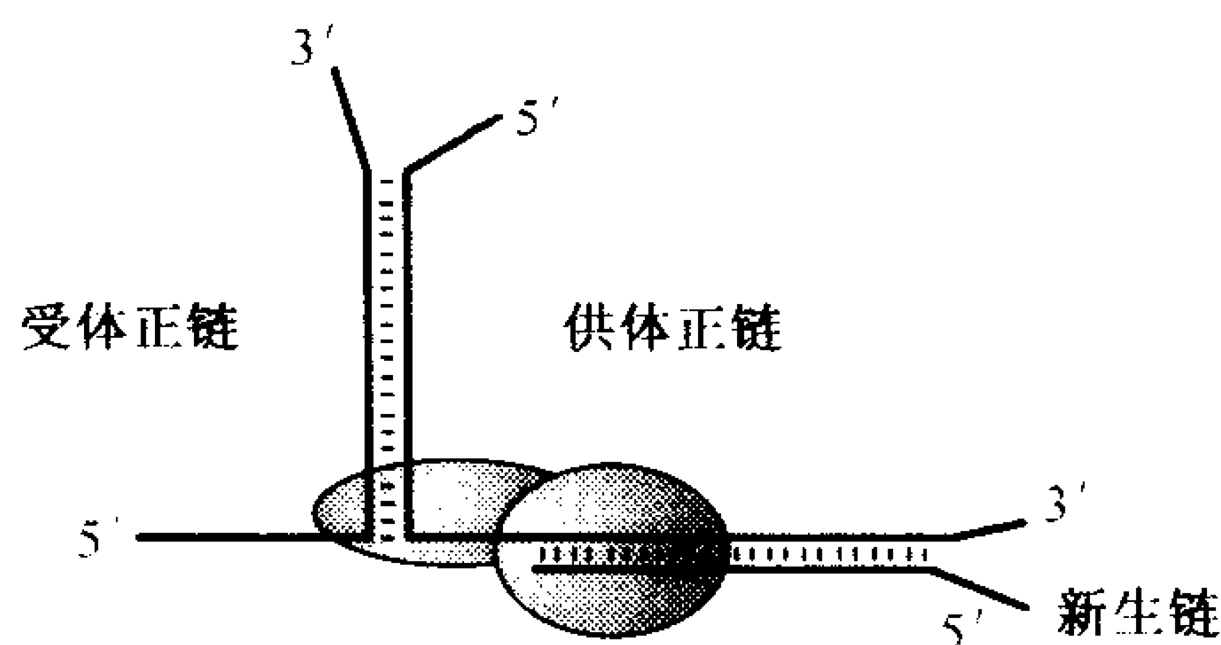


图8.32 BMV 同源重组的复制酶模板转换模型。(A)假定参与重组事件的 RNA 链和区域;(B)同源重组期间重组中间体的结构。据认为 BMV 复制酶在可形成临时"泡状结构"的富含 AU 区域进行模板转换。富含 GC 或 GC 含量一般的区域被认为通过提前终止的新生链和受体链之间的碱基配对能够稳定重组中间体。经允许,引自 Bujarski 和 Nagy (1996)。

Nagy，1996)，他们证明重组是基于异源双链分子，而且异源双链长度必须大于 30 nt。他们的模型提出，RdRp 通过异源双链区域存在困难，因此，模板偶尔转换到受体链上的互补区域（图 8.33)。

复制酶的诱变也提供了一些关于重组机制的信息。BMV 1a 蛋白的解旋酶结构域内的突变增加了重组的频率，而且把重组位点移到异源双链的极不稳定的部位（Nagy *et al*.，1995)。对此的解释是，突变降低了复制复合体的持续合成能力，有助于以较高频率进行模板转换。另一方面，RdRp (2a 蛋白）的突变降低了重组的频率（Bujarski and Nagy，1996；Figlerowitz *et al*.，1997)。

在最低选择压的条件下，使用 PCR 已经在 CMV 和相近的 TAV 一起接种的烟草植株中检测到了重组体（Aaziz and Tepfer，1999a)。RNA 3 的重组在两种病毒一起接种



2. 复制酶在异源双链区的下端滑动，重新在受体模板上开始新生链的合成

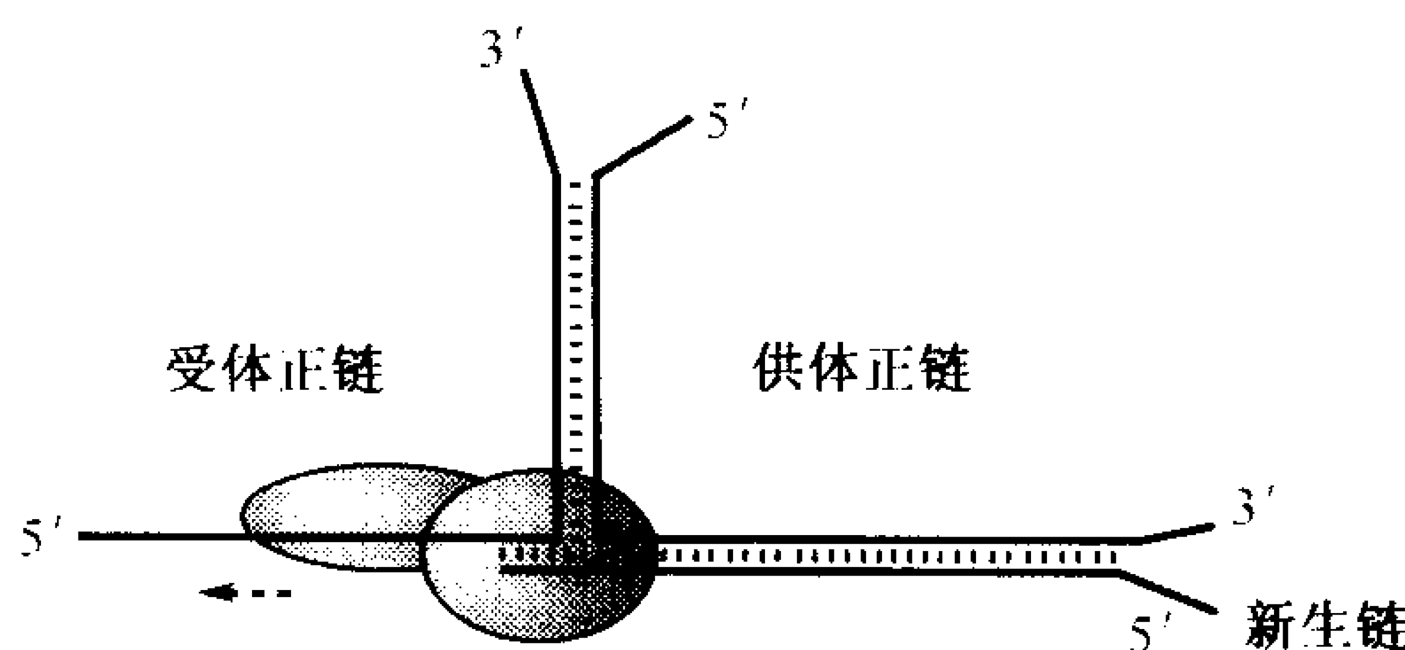


图8.33 异源双链(heteroduplex)介导的 BMV 异源重组的模板转换模型。经允许，引自 Bujarski 和 Nagy (1996)。

的 82 棵植株中的 3 株中被检测到，而且发生在几处具有高度序列相似性的部位。在所有的情况下，重组都是同源的。

b. 芜菁皱缩病毒的重组（Simon and Nagy，1996）

除了基因组 RNA 外，芜菁皱缩病毒（TCV）的侵染还时常存在卫星和 DI RNA 分子与其相伴随。sat-RNA D 是一种卫星 RNA，只有它的 3′端 7 个碱基与 TCV RNA 类似。sat-RNA C 是由近全长的 sat-RNA D 和来自 TCV 3′端区域的两个片段之间形成的一种嵌合分子（图 8.34）（参见第 14 章第Ⅱ节 B.2）。

在将 TCV 、sat-RNA D 和在 5′端存在缺失的 sat-RNA C 一起接种植物后，形成了不同种类的 sat-RNA D/sat-RNA C 重组分子群体。重组在紧靠稳定发夹上游的一个区域（称为模体Ⅰ）内发生（图 8.35）。

同样地，在 TCV 基因组 RNA sat-RNA D 之间又利用一个稳定发夹（模体ⅢA/ⅢB）上游的交换点（cross-over point）产生了重组体（图 8.35）。sat-RNA D 和 sat-RNA C 或 TCV 之间形成的重组体中大约 30%在重组位点含有非模板核苷酸。卫星 RNA 也存在多聚体形式，而且这些分子含有非模板核苷酸。当与 TCV 共同接种时，重组修复了 sat-RNA C 或 sat-RNA D 截短的 3′端。

这些结果导致 TCV 重组模型的提出（图 8.36）。在该模型中，TCV 的 RdRp 复制 sat-RNA D 的负链到达正常的 5′端或在有蛋白质结合位点的一些位置暂停。模体Ⅰ或模体ⅢA/ⅢB 发夹结构有助于 RdRp 和新生的 sat-RNA D 转换到 sat-RNA C 或 TCV 的受体负链上。然后，TCV RdRp 用新生的 sat-RNA D 的 3′端为引物，重新起始 RNA 合成，将受体 RNA 复制到重组体分子中。

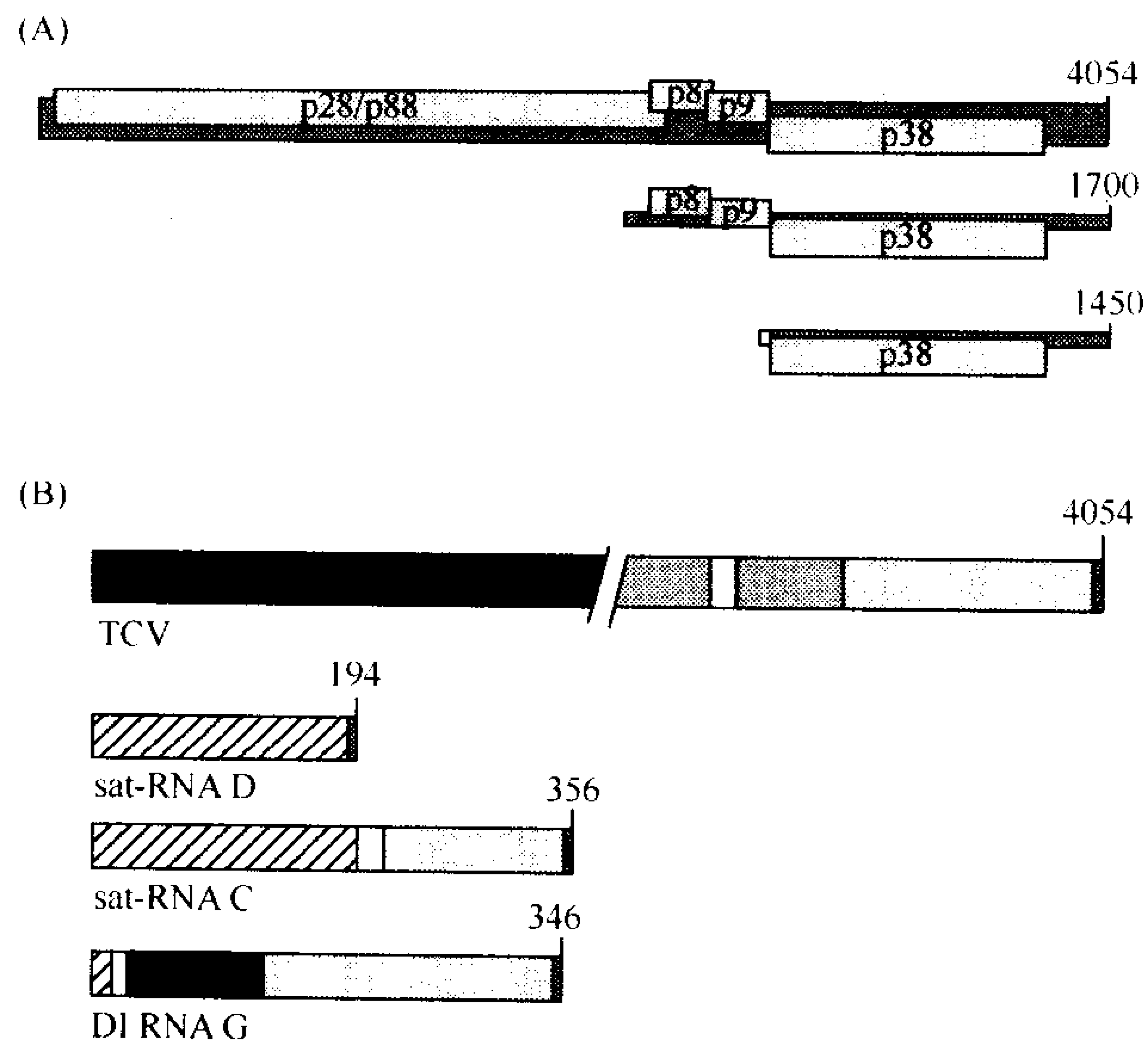


图8.34 （A）芜菁皱缩病毒（TCV）的基因组组构。此处显示了TCV的5个ORF和两个已知的亚基因组RNA。（B）与TCV相关的3个亚病毒RNA之间的序列相似性。相似的区域以同样的阴影表示。所有RNA的末端序列都是5′-CCUGCCC-3′。经允许，引自Simon和Nagy（1996）。

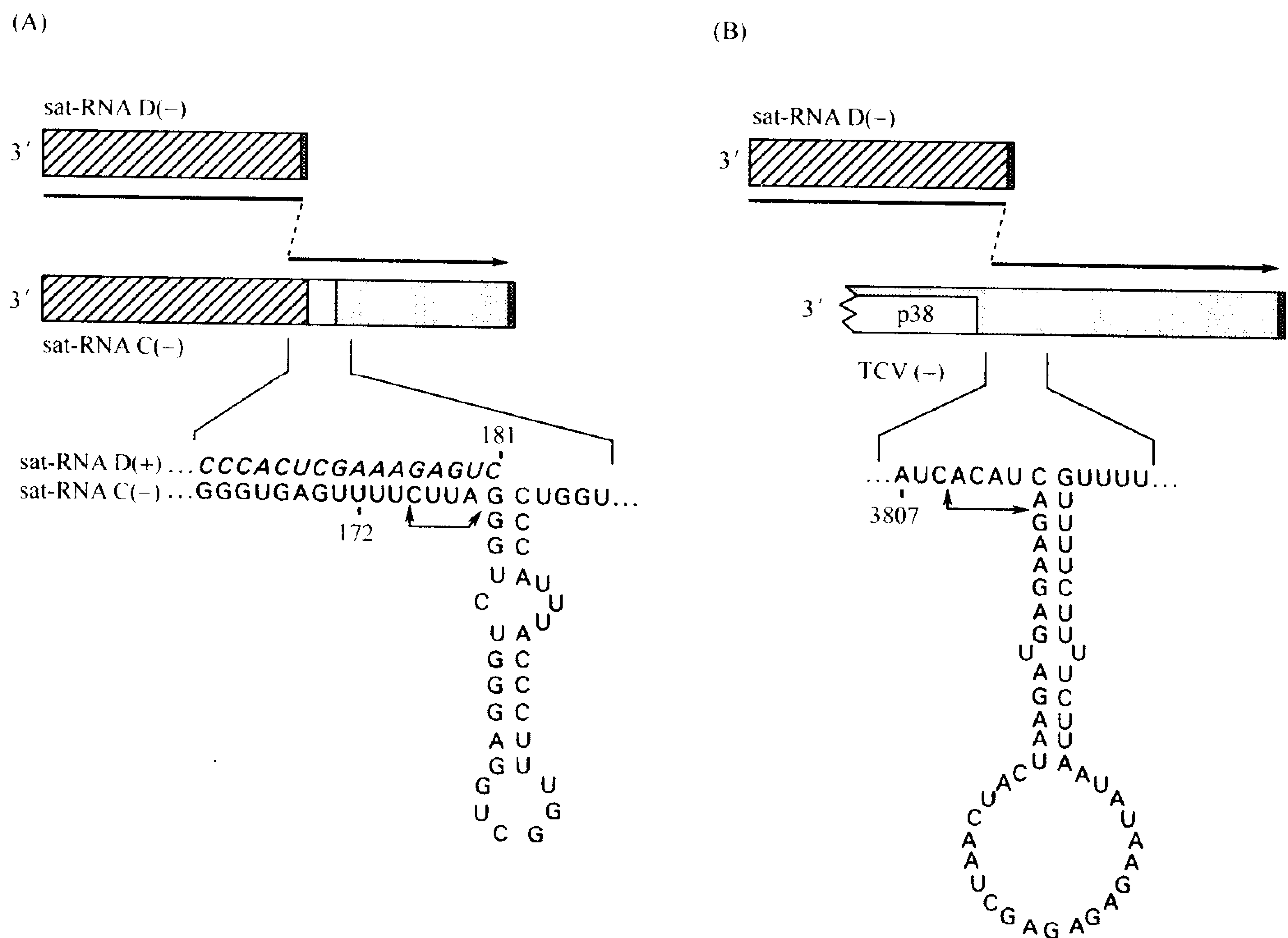


图8.35 （A）TCV sat-RNA D和sat-RNA C或（B）sat-RNA D与TCV之间的重组。由于认为重组在正链合成过程中发生，因此显示的是亲本分子的负链。指出了重组必需的模体Ⅰ和模体ⅢA/ⅢB发夹结构及其位置。箭头指出了sat-RNA C和TCV发生交换的主要热点位置。图中显示了新生sat-RNA D和sat-RNA C受体RNA上交换位点上游序列之间形成的潜在异源双链结构。相似的序列以同样的阴影表示。经允许，引自Simon和Nagy（1996）。

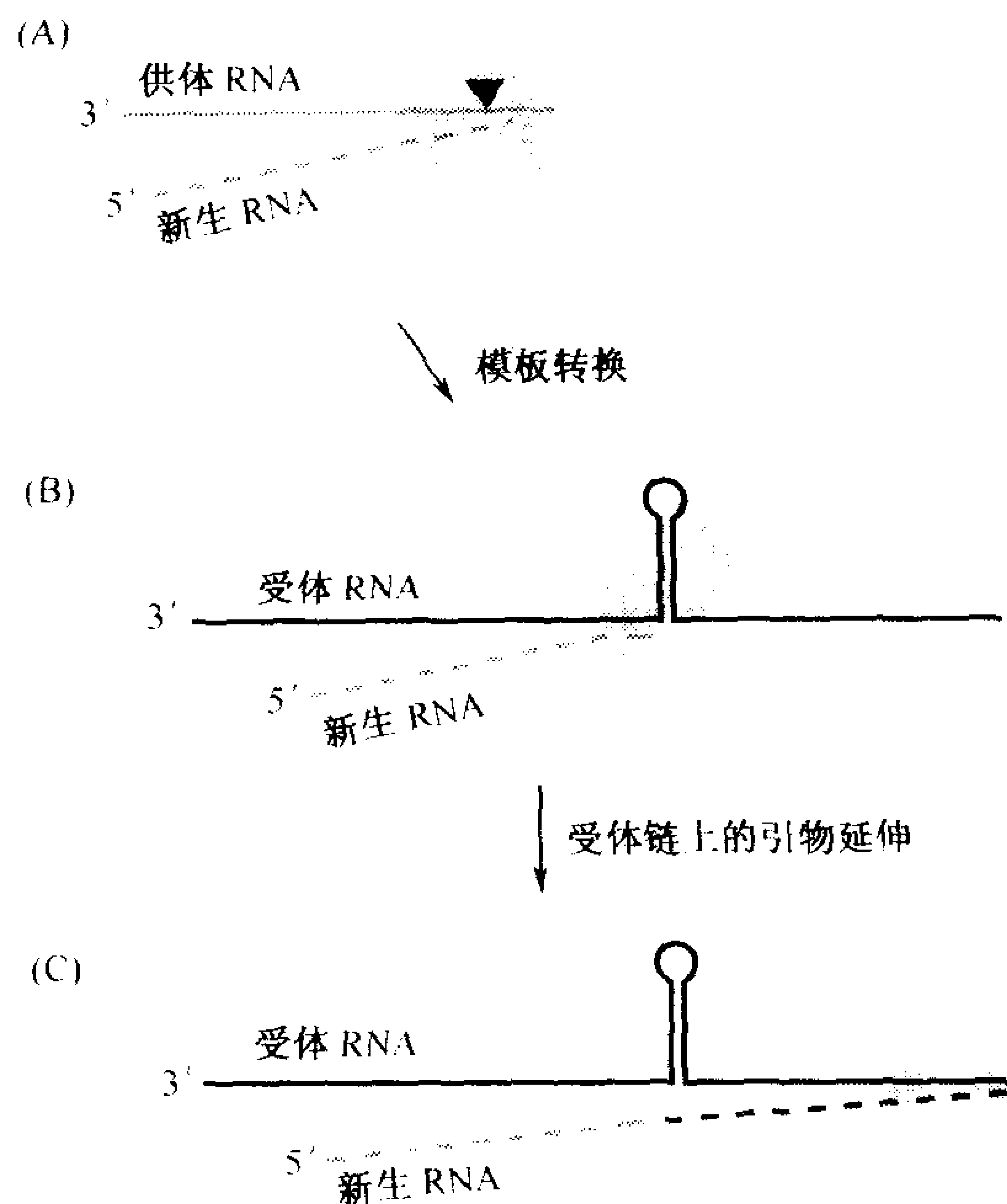


图8.36 TCV 系统的重组模型。(A) TCV RdRp 可以复制负链 sat-RNA D 至其自然的5′端，或者在由于存在蛋白质结合位点的某些位点(主要是从5′端开始13个核苷酸，用三角标注)暂停。或者，新生的 sat-RNA D 下游终止序列被外切核酸酶切除，从而导致有些分子截短。(B) 仍然与新生 sat-RNA D 链结合的 TCV RdRp 通过模体Ⅰ或模体ⅢA/ⅢB 发夹的促进而转换到 sat RNA C 或 TCV 受体模板负链上(图8.35)。新生链和受体链之间的杂交可能会稳定重组中间体。(C) TCV RdRp 用新生的 sat-RNA D 的3′端为引物，重新起始 RNA 合成。受体 RNA 进一步被 RdRp 拷贝导致重组 RNA 分子的形成。经允许，引自 Simon 和 Nagy(1996)。

3. CaMV DNA 的重组

如第Ⅶ节 B.1 所述，花椰菜花叶病毒科采用的反转录机制存在两个阶段：病毒粒体 DNA 在核内的转录和在细胞质内的反转录。因此，存在两种可能性，即在核内 DNA：DNA 重组和在反转录阶段的复制性重组（replicational recombination）。两种类型的重组均已被发现。

CaMV DNA 被转变为共价闭合的双链（ds）环以用于转录的事实表明，在侵染之后较早期一定涉及寄主植物的 DNA 修复酶（repair enzyme）。该观点被从质粒切下来的线状克隆的 DNA 具有侵染性，而且子代 DNA 是环状的事实得到巩固。用有缺陷的非重叠缺失突变体共同侵染植物通常导致有活性的病毒粒体产生（Howell *et al*.，1981）。后代 DNA 的分析显示，拯救（rescue）是通过重组而非互补作用（complementation）实现的。Lebeurier 等（1982）证明，多对重组且无侵染性的全长 CaMV 基因组整合在一个质粒的不同位点上，在接种一个合适的寄主后重新获得了侵染性。在后代病毒中，所有的质粒 DNA 已经被去除，而且病毒的 DNA 具有正常的结构。Walden 和 Howell（1982）进一步提供了有关基因组间重组的证据。

基于用一对异源的基因组所做的实验，Geldreich 等（1986）提出一个 CaMV 由 35 S RNA介导重组的模型。该模型提出，接种后不久，具有相同黏性末端的两个不同的 DNA 可以连接在一起得到一个二聚体 DNA。然后，此二聚体转录产生杂合的 35S RNA，它通过反转录形成重组的基因组。

为研究重组机制，Vaden 和 Melcher（1990）用一对突变的 CaMV DNA 接种芜菁植株，并用限制性片段图谱和测序对后代进行了分析。他们发现了两种 DNA：DNA 和复制性重组的证据。一些嵌合体在负链 DNA 合成的起始位点或附近以及在 35S 或 19S RNA 转录起始位点附近具有在双亲序列之间的结合点（junction）。这被看作是表明在反转录期间发生链转换的标志。发现的其他结合点与负链 DNA 合成不存在明显的关系，表明它们是由 DNA：DNA 重组所引起的。来自 CaMV DNA 大的基因间区片段插入物的缺失也暗示了非常规重组（illegitimate recombination）（Pennington and Melcher，1993）。

已经发现在附加体的（episomal）CaMV 与整合的病毒序列互作中存在类似形式的重组（参见第Ⅸ节 B. 5）。

4. 重组与整合的病毒序列（Hull *et al.*，2000）

人们发现的自然地整合进植物基因组内的病毒序列的数目在逐渐增加。迄今，已知全部的“DNA 病毒”（花椰菜花叶病毒科和双生病毒科）至少在其复制周期的一个阶段以 DNA 形式存在于核内。第一项报告是有关在烟草内存在部分双生病毒序列的多次正向重复序列，但是与病毒侵染无关（Bejerano *et al.*，1996），PVCV 能与碧冬茄（petunia）的基因组杂交（Richert-Poggler and Shepherd，1997），而且在烟草的基因组中已经发现类似副反转录病毒的（pararetrovirus-like）序列（Jakowitsch *et al.*，1999）。通过非常规重组使位于核内的病毒 DNA 序列插入寄主染色体内，这并不令人惊奇。然而，现在发现了游离型的侵染（episomal infection）能引起这种整合序列的两个事例。

对于大蕉（芭蕉属）（*Musa*）的某特定品种，特别是在组织培养和育种过程中会出现显然为自发的 BSV 的暴发（spontaneous outbreak）。最佳的研究条件是用品种 Obino l'Ewai（AAB 基因组）和与品种 Calcutta 4（AA 基因组）杂交的四倍体（Harper *et al.*，1999 b; Ndowora *et al.*，1999）。Obino l'Ewai 自身有时表现游离体 BSV 的偶然暴发，而其父本 Calcutta 4 从未出现游离体的 BSV。起因于整合的序列的游离体侵染（episomal infection）的证据如下：

（1）无症状亲本植物在杂交后，许多四倍体品系有最高达到 100%的侵染率。来自无症状母本植物的 Obino l'Ewai 组培苗具有较低的侵染率，而来自 Calcutta 4 的组培苗则无侵染。

（2）利用 BSV 引物对来自 Obino l'Ewai 总 DNA 的 PCR 和利用 BSV 序列对这些 DNA 进行的 Southern 印迹分析均得到阳性的结果，尽管利用免疫电子显微镜或免疫诱捕 PCR 没有检测到病毒（Harper *et al*.，1999a）。

（3）对来自 Obino l'Ewai 的基因组克隆的序列分析揭示了 BSV 的一个复杂插入片段（见下文），该序列与游离体病毒的序列具有 99%的同源性。

（4）利用序列特异的扩增多态性方法（sequence-specific amplification polymorphism，S-SAP）制备的克隆产物分为3类，其中之一由与BSV序列结合的大蕉（*Musa*）序列构成。

（5）荧光原位杂交（fluorescent *in situ* hybridization，FISH）分别揭示了BSV的一个主基因座和一个次基因座（minor locus）（Harper *et al.*，1999b）。

（6）通过染色体变性及展开后用荧光探针杂交的纤维伸展杂交法（fiber-stretch hybridization）表明，这些整合体（integrant）相当复杂（见下文）。

来自BSV的照片显示，存在两个整合位点（图8.37）。在每个位点都存在BSV序列一前一后的重复，其间点缀着*Musa*序列。主基因座含有超过150 kb的6个重复，而次基因座含有超过50 kb的三重复。BSV和大蕉序列的界面如同35S RNA转录物的5′端一样存在于相同的位点上。从那里开始，BSV序列的一个大约5 kb的片段是不间断的。然后，跟随BSV来源的短的序列以反向和正向组成一个区域，之后是一个反向的BSV片段。在其下游又是正向BSV的一个区域，并包含从第一个片段失去的部分基因组。该模型是7.4 kb游离体病毒基因组起源于整合体的两个重组事件（图8.38），这些事件由杂交和（或）组织培养导致的逆境（胁迫，stress）所致。

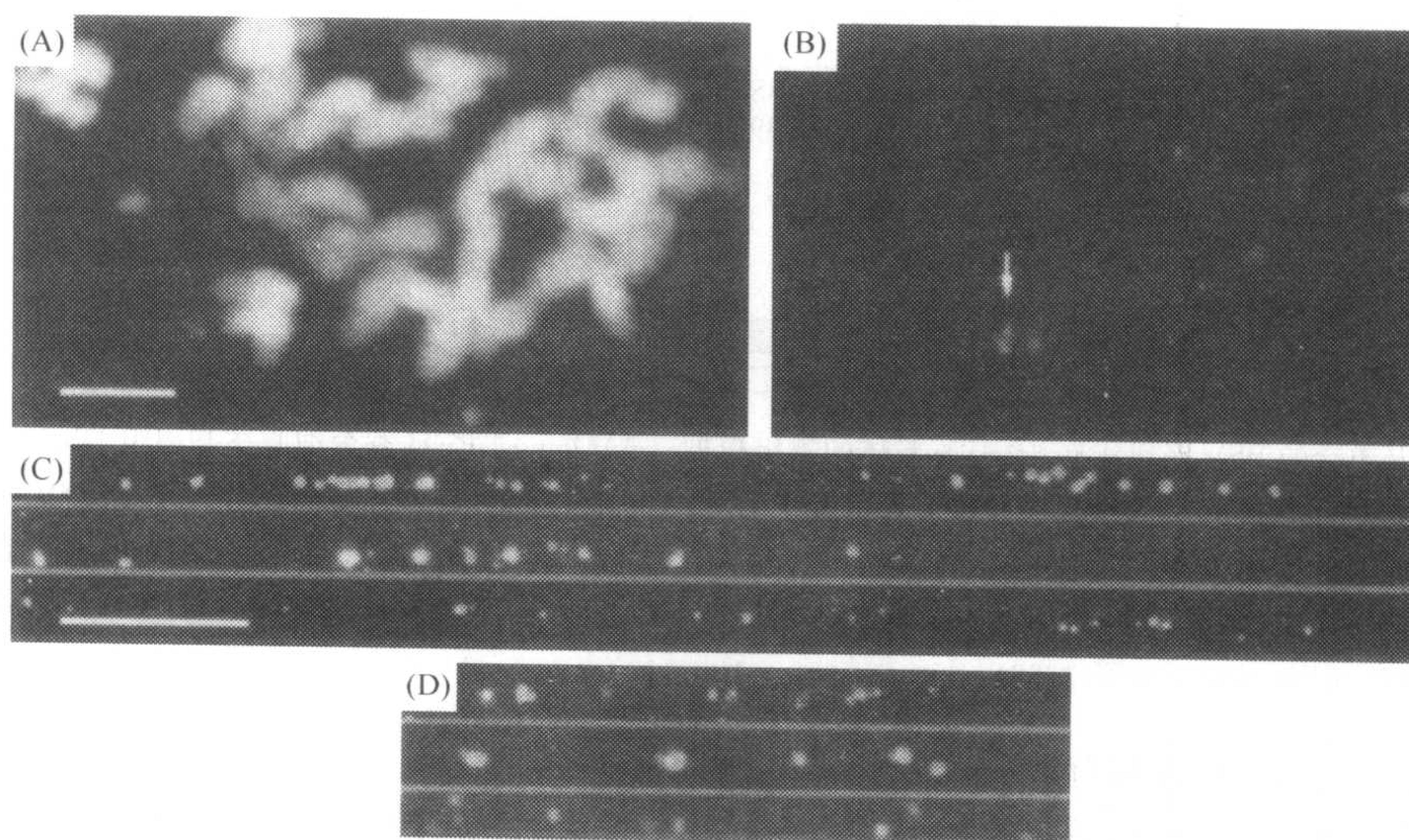


图8.37 （见彩色图版8.1）大蕉（*Musa*）品种Obino l′Ewai染色体的原位杂交。（A）和（B）中期染色体的杂交。（A）用DAPI（4,6-二脒基-2-苯基吲哚，4,6-diamidino-2-phenylindole）染色DNA而将染色体染成蓝色。（B）BSV的杂交位点（红色），显示在每一染色体中期（箭头所示）存在一主要位点和接近杂交灵敏度高限的至少一个次要位点（箭头）。比例尺＝5 μm。（C）和（D）伸展的染色体DNA纤丝的杂交。成串的点代表探针杂交位点，检测到两种不同长度的杂交模式，绿色所指是BSV，红色则是侧翼的香蕉DNA序列。（C）3种独立排列的长纤维状DNA。BSV及其两侧的大蕉序列以多拷贝形式存在于一个150 kb的结构中；比例尺＝5 μm 。（D）3种独立排列的短纤维存在于50 kb的结构中。经允许，引自Harper等（1999b）。

TVCV在杂种烟草（*Nicotiana edwardsonii*）上100%的种子传播（Lockhart *et al.*，2000）。症状仅在显著地变更昼长的情况下发生，而且游离体病毒只能在这样的植物中检测到。该杂种烟草的基因组克隆含有与游离体病毒同源性高于99%的序列。

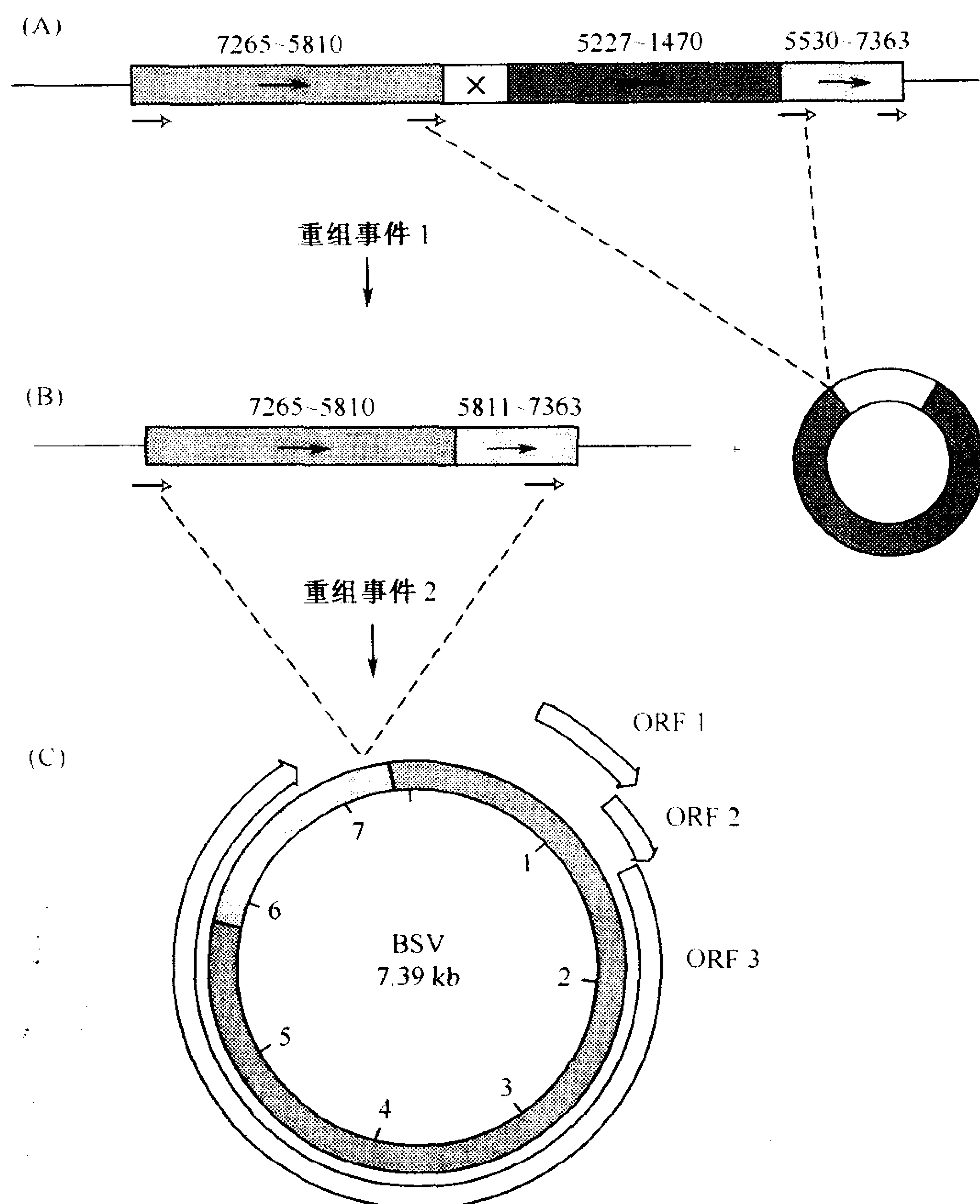


图8.38 从整合的 BSV 序列到游离体病毒粒体的重组模型。(A)Obino l'Ewai 香蕉细胞核基因组 DNA 上整合的 BSV 序列结构。序列上端的实线箭头和数字表示 BSV 序列和与游离病毒相对应的方向。X 是短的 BSV 序列的重排。空心箭头所指为正向重复。(B)BSV 的5530～5810处的280 bp 的正向重复第一次重组后的可能中间结构。(C) BSV 的7265～7363处的98 bp 的正向重复之间的两次重组后产生的游离病毒粒体的核酸序列。图中标出了推测的 ORF。经允许，引自 Ndowora 等(1999)。

TVCV 存在各种不同的有趣特征：

(1) 它似乎仅在与昼长相关的某一特定气候条件下被激活。在培育了杂种烟草(*N. edwardsonii*)的佛罗里达州还没有检测到该病毒的存在，而在明尼苏达州则检测到了上述该病毒。

(2) 用 Southern 印迹法在该杂种烟草的父本心叶烟(*N. glutinosa*)内检测到了 TVCV 的相关序列，但在其母本克利夫兰烟(*N. clevelandii*)内却没有检测到。然而，在该杂种烟草中的 TVCV 受到激活发生游离体侵染的相同条件下，心叶烟似乎并不会发生 TVCV 的游离体侵染。

(3) TVCV 序列已经在那些起源于南美洲的烟草属植物种体内检测出来，但在起源于北美或大洋洲（澳洲）的烟草种体内则未检测到。

因此，从发生整合的序列被激活的这两种病毒来看，逆境（胁迫，stress）是激活作用所必需的。而且，它们在不同的亲本基因组类型之间的杂交种中发生更为普遍。发

生整合的病毒属于副反转录病毒（pararetrovirus），但无论在整合体的结构还是游离体病毒的释放方面似乎与反转录病毒（retrovirus）都不相似。

PVCV 很可能具有整合序列受到激活从而释放游离体病毒的类似现象。

5. 重组和转基因植物

对含有游离体病毒部分基因组的转基因植物的侵染已经导致重组体的产生。然而，用这类实验解释在联合侵染中的重组时一定要谨慎。首先，要点为上面提到的有关重组体产生面临的选择压。其次，因为转基因在染色体中的位置及其在细胞核中的转录，可能存在与自然的联合侵染不同的区室化作用（compartmentalization）。转基因植物中已经发现 DNA 、RNA 和副反转录病毒的重组。

用缺损的 CaMV DNA 接种带有所缺损的基因序列的转基因植物，已经通过重组产生了有侵染性的野生型病毒或两个病毒株系之间的重组体（Gal *et al*.，1992；Schoelz and Wintermantel，1993）。对子代病毒的分析表明，DNA：DNA 和复制性重组两种情况都已发生。使用 CaMV 的两个分离物，Schoelz 和 Wintermantel（1993）鉴定了两次模板的转换，一个位于 35S RNA 的 5′端，另一个位于 19S RNA 的 5′端。这可能表明在负链 DNA 合成中的第一次链转换时（参见第Ⅶ节 B. 1 CaMV 的复制），反转录酶移动到 19S RNA 而非 35S RNA 的 3′端；当它到达了 19S RNA 的 5′端后，又返回到 35S RNA 模板上。然而，该系统产生了强烈的选择压，因为只有重组体才能侵染。在选择压比较小时，有重组发生但其比率较低（23 个植株中有 3 个）（Wintermantel and Schoelz，1996）。

用 CaMV 两个不同的株系整合的多聚体，Gal 等（1991）检测到了上述两种类型的重组。复制性热点经鉴定位于 19S RNA 启动子区域。在水稻中，对由 35S RNA 启动子驱动的构建物的整合体的分子鉴定也揭示出在该启动子中存在重组性热点（Kohli *et al*.，1999）。

已经报道了在菜豆金色花叶病毒属的 ACMV 的一个外壳蛋白缺失突变体与其外壳蛋白转基因之间的重组（Frischmuth and Stanley，1998）。当转基因也包含了共同区域（common region）时，重组的频率最高，表明该区域是一个重组热点。

侵染性的游离体 RNA 病毒的基因组和表达该病毒或一个相关病毒的一部分的转基因之间也可以发生重组。植物内表达 CCMV 外壳蛋白基因（来自 RNA 3）的 3′端 2/3 的转录物同一个缺乏外壳蛋白基因 3′端 1/3 的 CCMV 突变体之间发生了重组（Greene andAllison，1994）。相似地，重组已经在 TBSV 转基因和游离体侵染病毒之间（Borja *et al*.，1999），以及两种相关的黄瓜花叶病毒属病毒 CMV 和 TAV 之间检测到（Aaziz and Tepfer 1999a；1999 b）。

病毒的游离体侵染和转基因的病毒序列之间发生重组的可能性对转基因植物的田间释放的风险评估具有明显的提示。这方面的内容将在第 16 章第Ⅶ节 D. 2 中讨论。

C. 缺损性和缺损干扰核酸与粒子（Graves *et al*.，1996；White，1996）

重组能导致亲自亲本病毒基因组的 RNA 或 DNA 的亚病毒核酸分子的产生。这些

分子含有未改变的末端序列并且在一些情况下含有病毒基因组的一些内部序列。它们的复制依赖于其亲体病毒。在一些情形下，缺损的分子干扰亲本病毒的复制而且减弱由亲本病毒产生的症状；这些分子称为缺损干扰（DI）核酸。如果它们不干扰亲本病毒则被称为缺损性（D）核酸，如果由亲本病毒的外壳蛋白包装则称为有缺损性（D）病毒。在 RNA 和 DNA 病毒侵染的组织中都发现了 DI 和 D 核酸分子。

在表 8.6 中列出了 RNA 病毒的 D 和 DI 核酸和病毒。DI 和 D RNA 和病毒的缺损方式分为两个组。在第一组中，有缺损的 RNA 起源于一个单一内部的缺损，而在第二组中，它由亲本病毒基因组的一个嵌合体（mosaic）所组成。

表 8.6 缺损核酸与缺损干扰核酸

科/属	病毒	缺失的节段	缺损元件的类型	综述与参考文献
第 1 组				
呼肠孤病毒科 (*Reoviridae*)	WTV	RNA 2、RNA 5	D 病毒	介体传播能力丧失（1）
番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*)	TSWV	L RNA	DI RNA	编码聚合酶蛋白（2）
		M RNA	D 病毒	病毒的包膜丧失并可能丧失介体传播能力（2）
	PBNV	L RNA	D 病毒	(3)
弹状病毒科 (*Rhabdoviridae*)	SYNV			(4)
雀麦花叶病毒科 (*Bromoviridae*)	AMV	RNA 3	D RNA	参见第Ⅸ节 C. 1
	BBMV	RNA 2	DI RNA	在某些寄主上的症状加重、编码病毒的聚合酶；参见第Ⅸ节 C. 1
	CMV	RNA 3	D RNA	3a 蛋白缺失；编码外壳蛋白；参见第Ⅸ节 C. 1
长线病毒科 (*Closteroviridae*)	CTV	各种	D 病毒	(5)，可影响蚜虫传播（6）
烟草脆裂病毒属 (*Tobravirus*)	TRV	RNA 2	D 与 DI 病毒	介体传播可消除 DI（7）
马铃薯 X 病毒属 (*Potexvirus*)	ClYMV	各种	DI 与 D RNA	(8)
	BaMV	中心区	D 病毒	(8)
	CsCMV	中心区	D 病毒	(9)
真菌传杆状病毒属 (*Furovirus*)	SBWMV	RNA 2	D 病毒	介体传播能力丧失（1）
		RNA 3、RNA 4	D 病毒	介体传播以及侵染根部能力的丧失（1）
花生丛簇病毒属 (*Pecluvirus*)	PCV	RNA 2	D 病毒	介体传播的丧失（1）
甜菜坏死黄脉病毒属 (*Benyvirus*)	BNYVV	RNA 2	D 病毒	介体传播的丧失（1）
南方菜豆花叶病毒属 (*Sobemovirus*)	CfMV	中心区	DI RNA	(11)

续表

科/属	病毒	缺失的节段	缺损元件的类型	综述与参考文献
第2组				
番茄丛矮病毒科（*Tombusviridae*）	TBSV	各种		参见第Ⅸ节C.2
	TCV	各种		参见第Ⅸ节C.2

参考文献：(1) Graves 等 (1996)（综述）；(2) Nagata 等 (2000)；(3) Gowda 等 1998；(4) Ismail 和 Milner (1988)；(5) Bar-Joseph 等 (1997)（综述）；(6) Albiach-Marti 等 (2000a)；(7) Visser 等 (1999b)；(8) White 等 (1992)；(9) Yeh 等 (1999)；(10) Calvert 等 (1996)；(11) Makinen (2000)。

在雀麦花叶病毒科（AMV、BBMV、CMV）、马铃薯X病毒属（ClYMV）、烟草脆裂病毒属（TRV）、真菌传杆状病毒属（SBWMV）、花生丛矮病毒属（PCV）、甜菜坏死黄脉病毒属（BNYVV）、植物呼肠病毒属（WTV）和番茄斑萎病毒属（TSWV）中已经发现单一缺损DI和D RNA（表8.6）。迄今，从多分体的基因组病毒分离的所有有缺损的RNA都分在这一组。

多重缺损DI和D RNA是番茄丛矮病毒科的一些成员（表8.6）所特有的，并且已经对TBSV和TCV进行了详细的研究。单一缺损和多重缺损有缺陷的分子的例子将在下文中进行描述。

和天然的DI和D RNA一样，含缺损的人造分子已经被制备并且可被亲本病毒支持复制。例如，TYMV在外壳蛋白基因上有较小缺损的分子被亲本病毒支持的复制较弱，而在70 kDa的ORF上的一个大的缺损分子可以有效地复制（Dreher and Weiland，1994）。通过比较基于TMV的D RNA和它的辅助病毒复制的必要条件，揭示出TMV RNA顺式和反式复制的不同要求（Chandrika *et al*.，2000）。缺失某些3′端的假结（pseudoknot）减低了全长的TMV RNA的复制水平，但是不影响D RNA的复制。然而，3′端大多数的假结为全长的和D RNA复制所必需的。同源的3′端序列对D RNA的复制很重要，精确的要求似乎涉及最末的28个核苷酸和在类tRNA结构的氨酰基受体臂上的特定的假结。

1. 雀麦花叶病毒科的缺损型RNA（Graves *et al*.，1996）

与AMV和CMV有关的缺损RNA来自RNA 3，而且对症状产生和病毒积累没有明显的影响。CMV的D RNA通过除去3a ORF的一个片段的单一缺失所致（图8.39），但保持缺失下游的可读框（Graves and Roossinck，1995a）。

此缺损分子保留了一个有缺陷的细胞间移动蛋白和一个有功能的外壳蛋白。CMV D RNA在各种不同的烟草种中积累，但是在番茄、西葫芦和甜瓜上，D RNA只在接种的组织中积累而不能系统性移动（Graves and Roossinck，1995b）。而且在接种番茄、西葫芦子叶和叶片上都积累和包装，但仅在甜瓜接种子叶上积累但不包装。这表明在CMV D RNA的复制、细胞间的运动、系统性运动和包装中涉及寄主和组织特异性。

BBMV的缺失RNA起源于RNA 2，并且是一种DI RNA，因为它降低RNA 2的浓度。即使它降低了RNA 2的浓度，DI RNA的存在仍加剧了BBMV在一些寄主上的症状的严重度，引起症状比DI RNA不存在时早出现1～2天，并且变得更为严重，尤

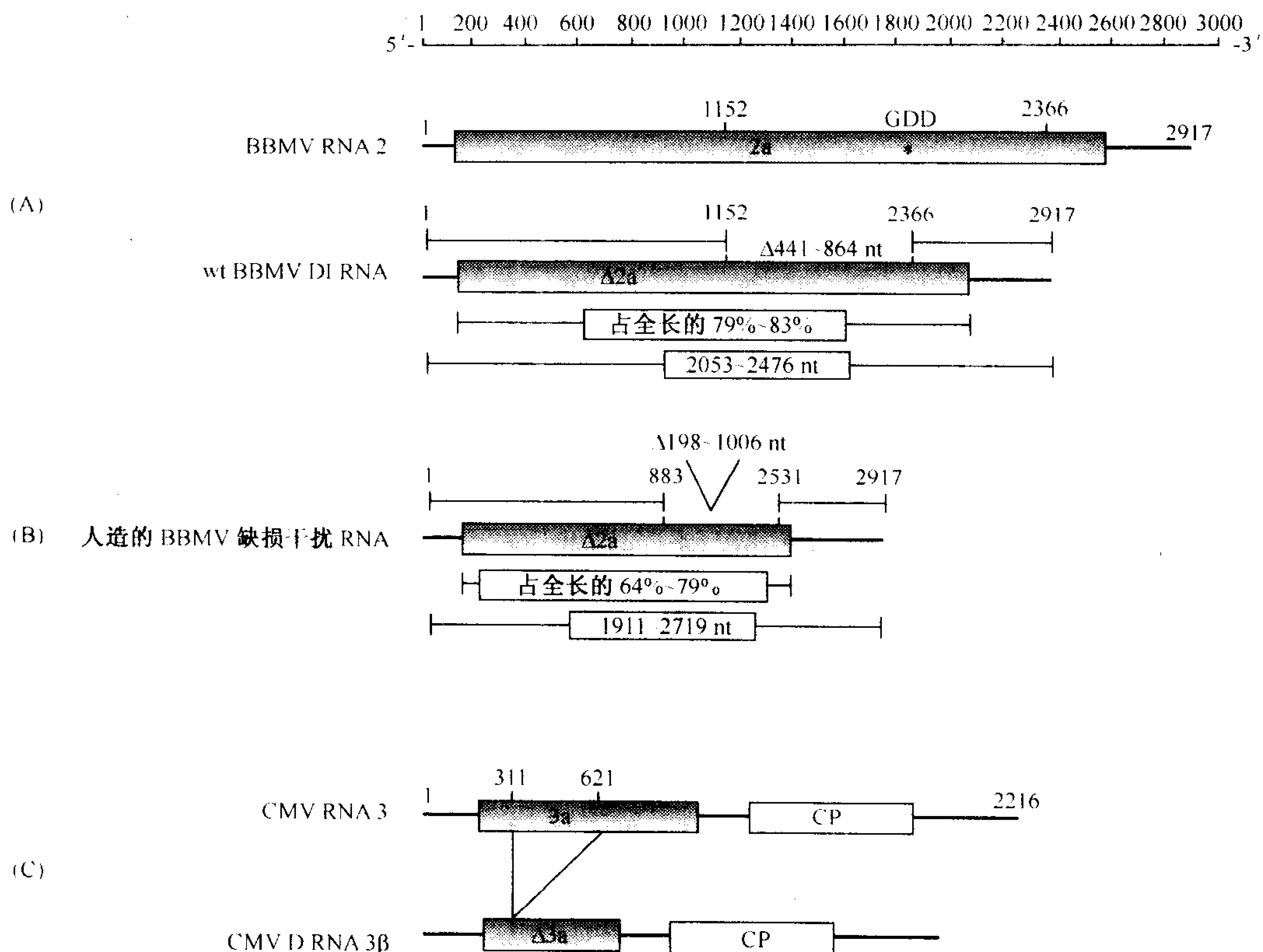


图8.39 来自于雀麦花叶病毒科(*Bromoviridae*)成员的缺损型 RNA。BBMV 和 CMV 缺损型 RNA 的示意图。5′和3′非翻译区以黑线表示。2a 和3a ORF 以灰色框表示，CP ORF 则以白色框表示。在2a ORF 中的 GDD 保守模体的大致位点以星号"*"表示。图的上方所示为核酸长度的比例尺。(A)BBMV 基因组 RNA 2(上部)和野生型病毒的 DI RNA(下部)。DI RNA 上方的数字线显示所有的野生型 DI RNA 中最短的5′端 和3′ 端保守序列。DI RNA 上方还显示了缺失片段的大小范围。DI RNA 下方的顶端数字线标出了和 DI RNA 的全长相比 Δ2a ORF 的长度。下方数字线则指出了野生型 DI RNA 的总长度范围。(B)BBMV 的人工 DI RNA。人工 DI RNA 在图(B)中标出。数据只是反映了在植物中可以有效积累的 DI RNA。(C)CMV 基因组 RNA 3(上方)和野生型 D RNA 3β(下方)。图中显示了3a ORF 的缺失区域。经允许，引自 Graves 等(1996)。

其在豌豆（*Pisum sativum*）品种 *Rondo* 中它是致死性的（Romero *et al*., 1993)。该内部缺失是在 2a ORF 上并且包括了该 ORF 产物作为 RdRp 功能的 GDD 模体特征（Romero *et al*., 1993；Pogany *et al*., 1995)。与 CMV 一样，其 ORF 下游区域的缺失区域与上游区域保持同相位，表明有效地翻译是制造和保持有缺失分子的一个重要特征。对 BBMV DI RNA 交界点两侧序列的分析显示，存在着短的互补和（或）相似的序列（Pogany *et al*., 1995)。一个 60 nt 的序列在分子的另一个部位中被重复插入形成的人工 DI RNA，如果以反向重复方式插入则生产较短的 RNA，但如果以正向重复方式插入则不产生较短的 RNA（Pogany and Bujarski，1996)。进一步的缺失发生在或接近由反向重复形成的发夹基部。这表明 DI 分子是在 RNA 复制期间通过重组形成的。

BBMV 产生 DI RNA 由已经通过自然和人工分子所确定的 3 个因素控制（Graves *et al*., 1996)：

（1）存在末端区域——DI RNA 保留了 5′端的 1152 nt 和 3′端的 468 nt；

（2）全长基因组的长度——缺失序列的长度是野生型 RNA 2 的 15%～30%；

（3）编码能力——DI RNA 保留 2a ORF 的一个至少包含 79%分子的缺失形式。

BBMV DI RNA 在局部枯斑寄主或一些系统性寄主中不积累而且不包装（Romero *et al.*，1993）。因此，与 CMV D RNA 一样，存在 BBMV DI RNA 复制和包装中涉及的寄主专化性。

2. 番茄丛矮病毒科内缺损干扰型 RNA（White，1996；White and Morris，1999）

有关 DI RNA 最早的一些报道来自对番茄丛矮病毒的研究。Hillman 等（1987）和 Morris 等（1989）描述了来自一 TBSV 培养物的符合 DI RNA 所有标准的异常 RNA。此 RNA 来源于通过 6 个内部的缺失的基因组的 RNA，长约 396 nt，而且 5′端和 3′端序列保守。缺失中的两个较大（1180 nt 和 3000 nt），其余的都很小。与小 RNA 共同接种在整株植物中降低病毒合成并且减弱病害症状。虽然 DI RNA 可以占叶片提取物病毒特异 RNA 的 60%，但包装 RNA 中只有 3%～4%为 DI RNA。原生质体实验显示 DI RNA 抑制 TBSV 基因组 RNA 的复制（Jones *et al.*，1990）。Burgyan 等（1989）记述了来自 CymRSV 一个培养物的一个类似的 DI RNA。与 TCV 关联的 DI RNA 是一个嵌合体（mosaic）分子，由来源于 TCV 的序列和 TCV 卫星 RNA 5′端序列相一致的核酸区域一起构成（Li *et al*.，1989）。该 DI RNA 也是与众不同的，它的存在使 TCV 所引起的病害更加严重。

目前已经在包括 CIRV 和 CNV 在内的番茄丛矮病毒科其他一些成员中发现了 DI RNA。自然发生的 DI RNA 为亲本基因组大小的 10%～20%（400～800 nt）。DI RNA 由保守的非邻近的基因组片段组成，亲本病毒的连续转接（serial passage）后在高复数（high multiplicity）侵染的条件下从头（*de novo*）积累产生的。这些分子抑制亲本病毒的积累，并且通常减弱这些病毒正常引致的严重症状。一般认为，DI RNA 在募集病毒的复制酶上比亲本病毒更加有效，而且症状减弱是亲本病毒浓度减少的一个直接结果。

TBSV 的 DI RNA 已被详细地研究，并且具有对番茄丛矮病毒属其他成员 DI RNA 所共有的特征。典型的分子由来源于亲本病毒的 4 个非邻近的片段（区域Ⅰ～Ⅳ）组成（图 8.40）。

区域Ⅰ和Ⅳ分别来自 5′端和 3′端，区域Ⅰ含有 5′非编码区和 5′ORF 的起始密码子，区域Ⅳ由 3′非编码序列构成。区域Ⅱ来自靠近 33 kDa 蛋白质终止密码子的下游区域，区域Ⅲ来自 22 kDa 蛋白质的 C 端区域。受侵染植物含有两类大小不同的 TBSV DI RNA，较大的在区域Ⅲ和Ⅲ之间不缺失，并被认为是较小分子的前体物。也存在一定数目的含有额外重复的分子，如分子区域Ⅱ的重复分子或整个 DI RNA 的直接重复二聚体。

通过利用天然 DI RNA 或人工制备的分子，已经确定了一些保守区域对分子复制的重要性（Chang *et al.*，1995；Havelda and Burgyan，1995；Havelda *et al.*，1995）。区域Ⅰ、Ⅱ或Ⅳ的缺失使 DI RNA 丧失了被亲本病毒复制的能力。区域Ⅳ含有在 DI RNA 积累中起重要作用的二级结构（Havelda and Burgyan，1995）。区域Ⅲ对

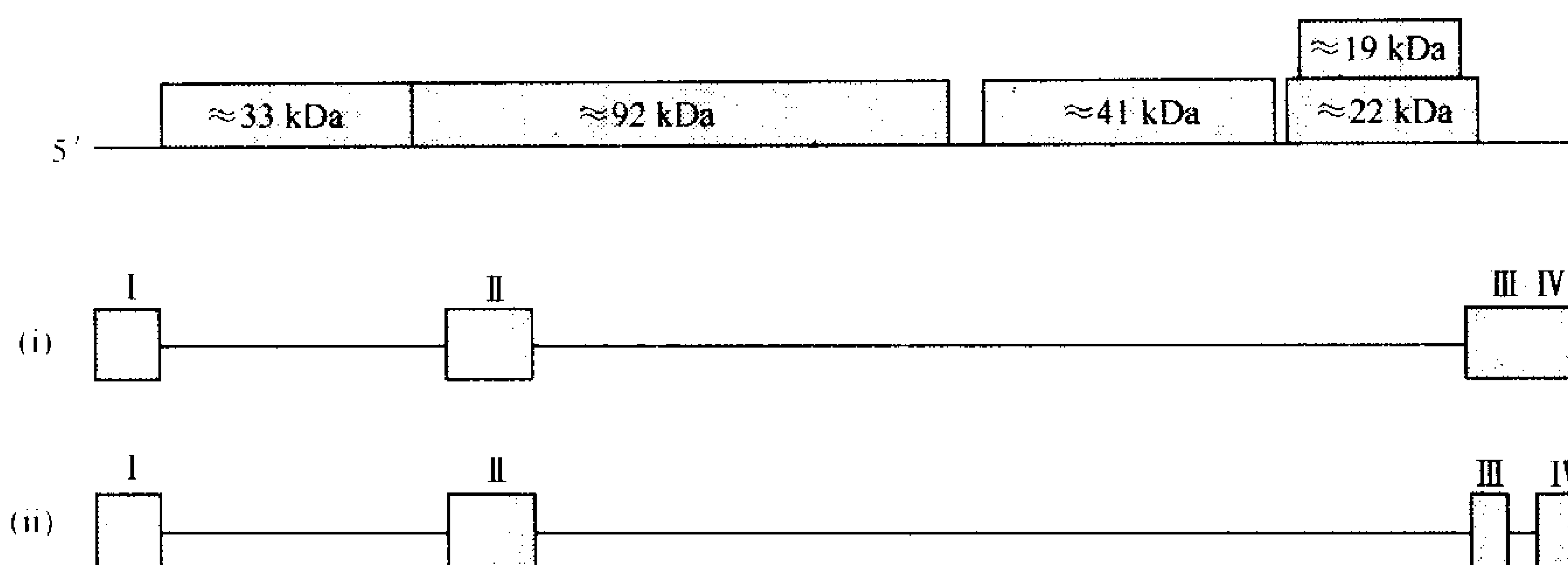


图8.40 一个典型的番茄丛矮病毒属病毒的 RNA 基因组和自然发生的 DI RNA 的示意图。图的上部在约4.7 kb 的基因组上，用编码蛋白近似大小标出了编码区的结构。来源于 TBSV DI RNA 的区域在下方用阴影框表示，缺失的区域用线表示。在所有鉴定的自然发生的 DI RNA 中存在4个一定程度上保守的区用罗马数字标注。(i) 较大种类的 DI RNA 含有3个非相邻的区域。区域Ⅲ/Ⅳ代表一个包含区域Ⅲ和Ⅳ之间的连续3′端片段。(ii) 一个原型的 DI RNA，含有4个明显的区域。经允许，引自 White(1996)。

CymRSV DI RNA 是必需的（Havelda *et al.*，1995），但不是 CNV 或 TBSV 所必需的（Chang *et al.*，1995）。

White (1996) 对导致番茄丛矮病毒 DI RNA 产生的缺失事件进行了详细地叙述。值得注意的是，番茄丛矮病毒属病毒的聚合酶似乎没有一个解旋酶的结构域（参见第Ⅳ节 B.2），因而它可能缺乏这一活性而导致复制错误。

3. 与 RNA 病毒有关的其他有缺损的 RNA

已经描述了豇豆花叶病毒 BPMV 的一个推定的 DI RNA（Sundararaman *et al.*，2000）。该分子是在来自明显健康豆荚 mRNA 的 cDNA 文库内发现的，并且似乎是 BPMV RNA 2 的一个缺失类型。

不同于正链 RNA 基因组的病毒也具有类 DI RNA。对于负链 RNA 基因组病毒，Adam 等（1983）描述了一个在 30 次继代接种后出现了与植物弹状病毒有关的类 DI 粒子的群体。Ismail 和 Milner（1988）从以 SYNV 长期侵染的杂种烟草（*Nicotiana edwardsonii*）上分离出 DI 粒子。大部分的 DI 粒子只有正常病毒长度的 73%～86%。它们独自没有侵染性，但当与完整病毒共同接种时，它们有比侵染性的病毒粒体更高的复制程度。

比正常 dsRNA 短的片段与不能传播的 WTV 分离物有关。Nuss 和 Summers（1984）研究显示，这些 RNA 是由缺失达到 85%的基因组的 RNA 片段形成的，产生与转录、复制和包装功能有关的末端保守的 RNA。这些分离物在叶蝉单层培养细胞内干扰正常病毒的产生（Reddy and Black，1977）。

4. 与 DNA 病毒有关的缺损型 DNA

MacDowell 等（1986）在双生病毒 TGMV 制剂内鉴定出了小于全长的一类 DNA。这些长度略有差异的 DNA 均来自基因组 DNA B，通过缺失约一半的 DNA 形成。一个与 ACMV 有关的 DI DNA 干扰两个基因组组分的复制（Frischmuth and Stanley，

1991)。这些 DNA 延迟了症状表达，在这一方面与动物病毒的 DI 核酸类似。一个有缺陷的 DNA 群体与 AYVV 有关（Stanley *et al* ., 1997）。它们大小全部约为 AYVV 基因组 DNA 的一半，并且含有基因间区和 ORF C1 的 5′端，也含有一些与 AYVV 序列不相关的额外的序列（图 8.41）。它们能改善 AYVV 在本生烟上的症状，因此说明它们是 DI DNA。

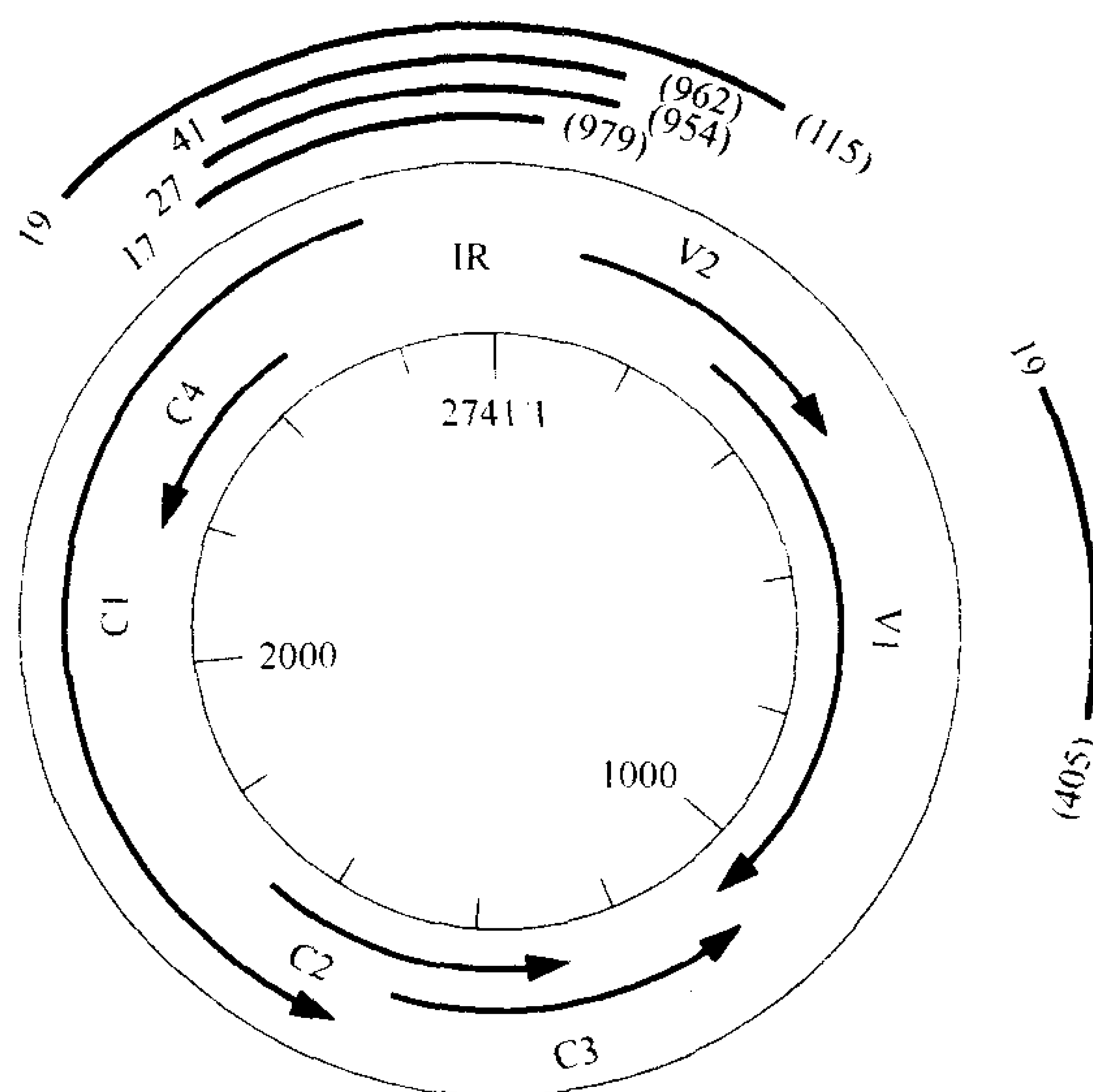


图8.41 缺损型病毒 DNA 中保留的 AYVV DNA 序列。病毒粒体链基因（virion-sense gene）V1 和 V2 的定位，互补链（complementary-sense）基因（C1～C4）和基因间区（IR）的位置显示在 AYVV 的基因组图谱中。不同的克隆中保留的 AYVV DNA 序列显示在图谱外部。括号中的数字指出了每种缺损型 DNA 相关的非病毒核苷酸的数目。经允许，引自 Stanley 等（1997）。

第X节 混合的病毒装配

在病毒一个株系的 RNA 和另一个株系的外壳蛋白之间（Okada *et al*., 1970; Okada, 1986b）、在无亲缘关系病毒的 RNA 和蛋白质之间（Matthews, 1966）、在一种病毒的 RNA 和两个不同的外壳蛋白之间（Wagnerand Bancroft, 1968; Talianski *et al*., 1977）均可以在体外发生混合的病毒装配。Hammond 等（1999）论述了混合侵染。更为有趣的是在体内形成的混合的病毒粒体。

当两种病毒在相同的组织中一起增殖的时候，可能会形成这样一些子代粒子，即由一种病毒基因组包被在由另一种病毒的结构成分部分或完全构成的粒子内。在侵染动物的有包膜病毒中，混合的侵染可导致产生一种病毒核蛋白由另一种病毒的包膜包裹的结构。这种混杂的粒子，称为假型（pseudotype）病毒，在有包膜的植物病毒上还未观察到。它们有可能存在于侵染植物的弹状病毒科成员中。

还可能会形成其他类型的混合粒子。这些粒子由一个无包膜病毒的基因组装入一个完全由另一种病毒或株系的亚基构成的蛋白衣壳内，这种现象被称为基因组掩蔽（genomic masking）、异源的包裹（heterologous encapsidation）、异源包裹（heteroencapsidation）或异体包裹（transencapsidation）。当蛋白质外壳由来自两种病毒的蛋白质混合物所组成时，则被称为表型混杂（合）（phenotypic mixing）。

Dodds 和 Hamilton（1976）叙述了用于研究表型混杂的方法。利用植物在高温生长时 TMV 外壳蛋白与其 RNA 不能形成杆状粒子的缺损型突变株，已经完成了对表型混杂的各种研究。当这种株系和典型 TMV（或一些其他能在较高温度下形成病毒杆状粒子的株系）混合侵染后，一定比例的子代含有由竞争性株系外壳蛋白形成的杆状粒子包装的缺损株 RNA（Schaskolskaya *et al.*，1968；Sarkar，1969；Atabekov *et al.*，1970 b）。

这种混杂只有在两种病毒的 RNA 和一种有功能的外壳蛋白存在的情况下可能发生（Atabekova *et al.*，1975）。另一方面，Otsuki 和 Takebe（1978）研究表明，当 ToMV 与 TMV 一起接种原生质体的时候，一些后代个体的杆状粒子是由两种外壳蛋白的混杂包装的。

BYDV 株系表现出对蚜虫介体的专一性（参见第 11 章第Ⅲ节 H.1）。当由某一特定介体正常传播病毒的一个株系与另一个无血清学关系、不能由该种蚜虫传播的株系双重侵染燕麦时，后者就可以被该种蚜虫传播。Rochow（1970）指出，此类传播是由于第二个株系的一些 RNA 已经被装配到正常传播株系的蛋白衣壳内所致。通过对侵染禾谷类黄症病毒属的 4 个分离物的混合侵染的分析，Wen 和 Lister（1991）证明了在 CYDV-RPV、BYDV-MAV、BYDV-PAV 和 BYDV-RMV 的不同组合之间的异源包装。在大多数的组合中，异源包装是双向的，但在 CYDV-RPV+ BYDV-PAV 和 CYDV-RPV+BYDV-MAV 两种情形下，仅由 CYDV-RPV 提供衣壳，异源包装是单向的。

利用已建立的一种理想的免疫杂交程序直接证明，在田间的混合侵染中，BYDV 一个非蚜虫传播的株系可被装入由一蚜虫传播株系的蛋白衣壳内（Creamer and Falk，1990）。同样地，在马铃薯 Y 病毒属病毒中表型混杂也已被证明。Bourdin 和 Lecoq（1991）研究指出，ZYMV 的一个因其外壳蛋白上某一个缺陷而不能蚜虫传播的分离物，与一个可传播的 PRSV 株系共接种时，其能够被蚜虫传播。免疫电子显微镜检查揭示了由两种病毒外壳蛋白所致的异源包装或转移包装产生的粒子（图 8.42）。

如 Dodds 和 Hamilton（1974）所示，表型混杂能在两个无亲缘关系且大小有差异的螺旋对称病毒之间发生（大麦上的 TMV 和 BSMV）。甚至已发现在一螺旋对称病毒（BSMV）和一个二十面体病毒（BMV）之间的表型混杂（Peterson and Brakke，1973）。

有关幽影病毒属的基因组由黄症病毒的外壳蛋白所包裹的异源包装将在第 11 章（第Ⅲ节 H. 1.a）中进行论述，有关由转基因表达的外壳蛋白所进行的异源包装将在第 16 章（第Ⅳ节 E.1）中讨论。

表型混杂的存在也暗示了两种不相关的病毒或两个相关的株系至少在一些情况下能在同一个细胞中一起复制。

有区别的内含体的形成已经用来证实两种无关的病毒可以在相同的细胞中复制，如

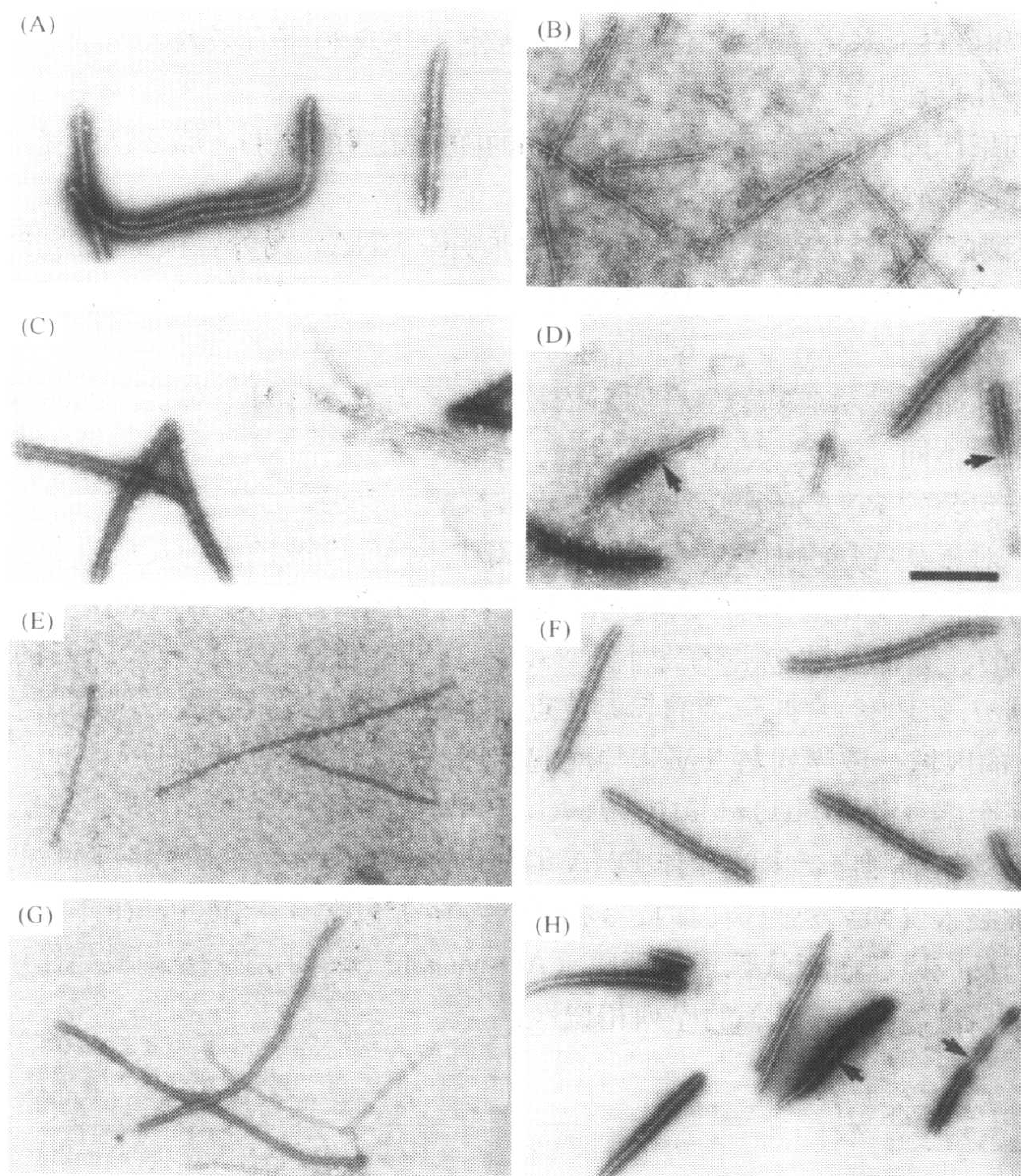


图8.42　病毒提纯制剂的电子显微照片：(A)和(E)PRSV (-E2)；(B)和(F)ZYMV (-NAT)病毒；(C)和(G)这些病毒提纯液1：1的混合物；(D)和(H)从被 PRSV-E2和 ZYMV-NAT 混合侵染的植物中纯化的提纯液。铜网被包被上 PRSV 和 ZYMV 抗血清混合物，然后俘获的粒子用 PRSV 抗血清[(A)～(D)]和 ZYMV 抗血清[(E)～(H)]修饰。在人工混合物中，粒子被修饰或未被修饰(C)和(G)，而在双侵染的植物提取液中，无论用哪种抗血清进行修饰，一些粒子都出现部分被修饰的结果(箭头)(D)和(H)。比例尺＝400 nm。承蒙版权所有者(American Phytopathological Society)惠允，引自 Bourdoin 和 Lecoq(1991)。

在烟草上的 TMV 和 TEV（Fujisawa *et al.*，1967）、在芸薹（*Brassica perviridis*）上的 TuMV 和 CaMV（Kamei *et al.*，1969）、在大豆内的 SMV 和 BPMV（Lee and Ross，1972）。

用 TMV 加上 PVX 或 PVY 加上 PVX 双重侵染烟草叶片，没有检测到一种病毒的 RNA 与另外一种病毒的外壳蛋白之间的异源包装（Goodman and Ross，1974b）。对此，一种可能的原因是，尽管一种病毒的相近株系可能在细胞的相同区域中复制，不同的病毒可能是在同一细胞内分离的不同位点或病毒质内积累的组分进行装配所致。此类装配

位点的分离可能不总是完全彻底的。

RNA 和蛋白亚基定位在细胞内的一个区室中会有利于有效且特异性的病毒装配。对此有如下几点理由：

（1）如果体内装配是在蛋白质亚基之间的随机相遇的结果，那么这些亚基维持一个局部的高浓度将有助于病毒的高效装配。

（2）因为亚基能包装周围的适当大小的非病毒 RNA，另外，极少量的非病毒 RNA 通常存在病毒粒体中，因此，游离体的寄主 RNA 一定要尽量多地被排除在装配位点之外。

（3）体外研究显示亚基的聚合明显依赖于离子环境和 pH。对于不同的病毒这些体外特定的条件不同。

（4）未包装的 RNA 必须受到保护免于被核酸酶攻击。

不过，对于某些病毒而言，有一定量的寄主 RNA 可被掺入到类病毒粒体或假病毒体内。已有报道，TMV 不同株系制剂的这类粒子可达到 2.5%（Siegel，1971；Rochon *et al.*，1986）。大部分被包装的寄主 RNA 是 18S 核糖体 RNA（rRNA）的 5′端区域（Rochon *et al.*，1986）。此包装的起始位点已经定位到从该 rRNA 5′端第 157 位开始的一个 43 nt 的区域。该序列与 TMV 装配起始序列具有有限的相似性（图 5.14），但它可折叠成一个茎-环结构（Gaddipati *et al.*，1988）。

在受侵染的细胞内，由叶绿体 DNA 编码的核酮糖-1，5-二磷酸羧化酶的大亚基的 mRNA可被装入 TMV 外壳蛋白内。该 mRNA 至少包含 3 个位点，在体外能够与外壳蛋白聚集物反应以起始杆状粒子的形成（Atreya and Siegel，1989）。最起作用的位点与 TMV 上的起始位点具有显著的序列相似性。

第Ⅺ节　讨论

病毒的复制机制主要有 3 种类型：从 DNA 直接复制 DNA，DNA 和 RNA 之间转换以及从 RNA 到 RNA 复制。每一种类型均面临着各自不同的问题，以及复制到一定水平在不引起目前的寄主无法挽回的损害的前提下确保能转移到一个新寄主上增殖的共同问题。

从 DNA→DNA 复制的病毒利用寄主复制系统完成这一个过程；然而，此复制系统通常仅在细胞分裂期间活跃。如在第Ⅷ节中详细论述的，双生病毒和矮缩病毒具有“开起”寄主 DNA 复制酶的机制，因此可以克服此限制。

通过 DNA→RNA→DNA 和 RNA→RNA 途径进行的核酸复制在未侵染的植物细胞内不常见。虽然植物基因组含有反转录转座子，但大部分由于突变而不活跃，而且活跃的转座子仅在某些特定胁迫（逆境）下开始复制。此外，它们的复制据认为受到寄主防卫系统的控制（参见第 10 章第Ⅳ节）。花椰菜花叶病毒科病毒利用此路径复制它们的基因组，在 DNA→RNA 复制阶段由寄主酶系统实现，在 RNA→DNA 阶段由病毒编码的酶活性完成。这些病毒如何克服寄主对反转录转座子没有约束的复制的限制还不清楚。然而，游离型的复制机制不涉及整合进寄主基因组的事实可能在此起一定的作用。如 BSV 和 TVCV 等病毒的复制是游离型的，而病毒的序列进入寄主基因组内的整合只

提供接种物，并不是复制机制的一个完整的部分。然而，在考虑对复制的反转录路径的限制上，一定要认识到，动物反转录病毒涉及一个整合阶段，游离型复制即便有也很少。还没有在植物中发现的其他寄主防卫系统，如免疫-监视系统，有可能发挥作用。

从 RNA 到 RNA 的合成还没有被认为是未受侵染植物中的一个主要的机制。如第 10 章第Ⅳ节所述，核酸复制的这一途径也被一种寄主防卫系统所利用。此外，反义 RNA 的形成对基因表达调控的重要性正在逐渐被认识到（Terryn and Rouzé，2000）。然而，大多数植物病毒利用病毒编码的酶系统连同一些寄主编码的因子通过这一途径进行复制。与那些侵染其他生物界的病毒（表 4.1）相比较，植物病毒对这一机制的利用为何如此普遍尚不清楚。

如前面所述，植物中存在对病毒无约束复制的各种控制，以限制对寄主的有害影响。在第 17 章将讨论，自然界存在着对病毒的选择压以避免过度地损害其自然寄主。从进化观点看，病毒引起对作物的损害对病毒自身也是不利条件。因此，存在我们刚开始理解的对病毒复制的内在控制（control built in）。这些控制包括控制基因表达以便在某一时期以一定数量生产病毒编码的因子和酶，以及通过包装将新合成的病毒基因组囚禁在病毒外壳蛋白内。

除合成新的基因组外，病毒的复制也产生突变，它是病毒适应（adaptation）和进化的基础。这些内容将在第 17 章中讨论。

第9章 病害的诱发Ⅰ：病毒在植物体内的移动及其对植物新陈代谢的影响

第Ⅰ节 导言

病毒传播机制通常是病毒最初被引入植物体内的一个或几个细胞（参见第11、12章），随后病毒在细胞中进行复制（第8章已讨论过）。病毒为了引发病害，必须扩散到植物体的大部分，并进行复制。在这一阶段，病毒基因组与寄主基因组相互对抗，病毒企图建立侵染而寄主努力抵抗病毒的侵染。在大多数情况下，这两种冲突力量实质上达到一种平衡。对病毒来说，在其传播到其他寄主植物之前就将寄主杀死是没有好处的。然而，正如第12章将要讨论的，症状的产生有可能促进病毒的传播，特别是对由节肢动物传播的病毒。

本章和下一章将讨论病毒和寄主基因组之间的许多相互作用。此处首先介绍病毒如何从初始侵染点移动出去而产生系统侵染，并描述病毒移动对植物新陈代谢所产生的影响。

第Ⅱ节 病毒的移动和最终分布

一些病毒被局限在接种的叶片中，而另外一些可以在植物中进行系统移动。如果一种病毒能够在初始侵染的细胞内复制，但不能移动到相邻的细胞，我们就可能检测不到该病毒的复制。这一现象称为阈下侵染（subliminal infection），它还涉及该病毒的寄主范围（参见第3章第Ⅴ节）。通常是通过发现一种病毒具有侵染原生质体的能力，但却明显地不能侵染寄主植物来鉴定阈下侵染的（Hull，1989）。在许多寄主-病毒组合的相互作用中，病毒的细胞间移动受阻，在侵染的组织中的相当小的区域产生肉眼可见的局部坏死斑，这种坏死斑通常是由萎蔫或死亡的细胞构成的。在其他一些病毒的侵染中，病毒在侵染叶片内的移动不受限制，但并不发生系统扩散。

在过去的大约10年中，关于病毒在植物中如何移动的了解迅速增加，这使得我们对病毒和寄主的相互作用有了更加正确的评价，并导致了对病毒编码的、参与病毒细胞间移动的蛋白质（移动蛋白，movement protein，MP）和控制病毒移动的多种因子的性质的确定。有一些综述文章介绍了病毒在植物中移动的研究进展，增进了我们对这方面的理解（Hull，1991；Lucas and Gilbertson，1994；Maule，1994；McLean *et al.*，1994；Carrington *et al.*，1996；Lartey and Citovsky，1997；Ding，1998；Nelson and van Bel，1998；Lazarowitz and Beachy，1999；Santa Cruz，1999）；Pennazio等（1999）就病毒的细胞间移动做出了历史性展望。目前的证据表明病毒移动与病毒的复制密切相关，且病毒移动是一个动态调节的级联事件。

A. 病毒在植物中移动的路径

Samuel（1934）最早提出，病毒采用两个基本的路径在植株中移动而产生系统侵染：细胞到细胞的移动（细胞间移动）和长距离移动。细胞间的移动（或短距离移动）是从最初侵染的细胞（通常为表皮细胞或叶肉细胞）移动到维管束鞘。然后通过维管束组织（通常为韧皮部筛管）进行长距离运输。最后通过进一步的细胞间的移动而建立对幼嫩叶片的系统侵染。例外的情况是，限制于韧皮部的病毒不需经过第一阶段的细胞间移动，直接由其介体注入到韧皮部（参见第11章第Ⅲ节H.1）。在多数情况下，移动过程中有3个主要的屏障：①从初始侵染的细胞中移动出去；②自薄壁组织细胞移动进入维管束组织；③自维管束组织移动到新侵入叶片的薄壁组织细胞。下面将具体描述这3种以及各种各样的其他屏障。

因为病毒不能直接穿过细胞壁，必须利用连接相邻细胞的细胞质的胞间连丝。正如Gibbs（1976）最初指出的，病毒粒体，或者即使是自由的、折叠的病毒核酸，都因体积太大而不能通过未经修饰的胞间连丝（图9.1）。因此，必须增加胞间连丝的大小排阻限（size exclusion limit，SEL），而病毒的移动蛋白（MP）可以促进SEL的增加。

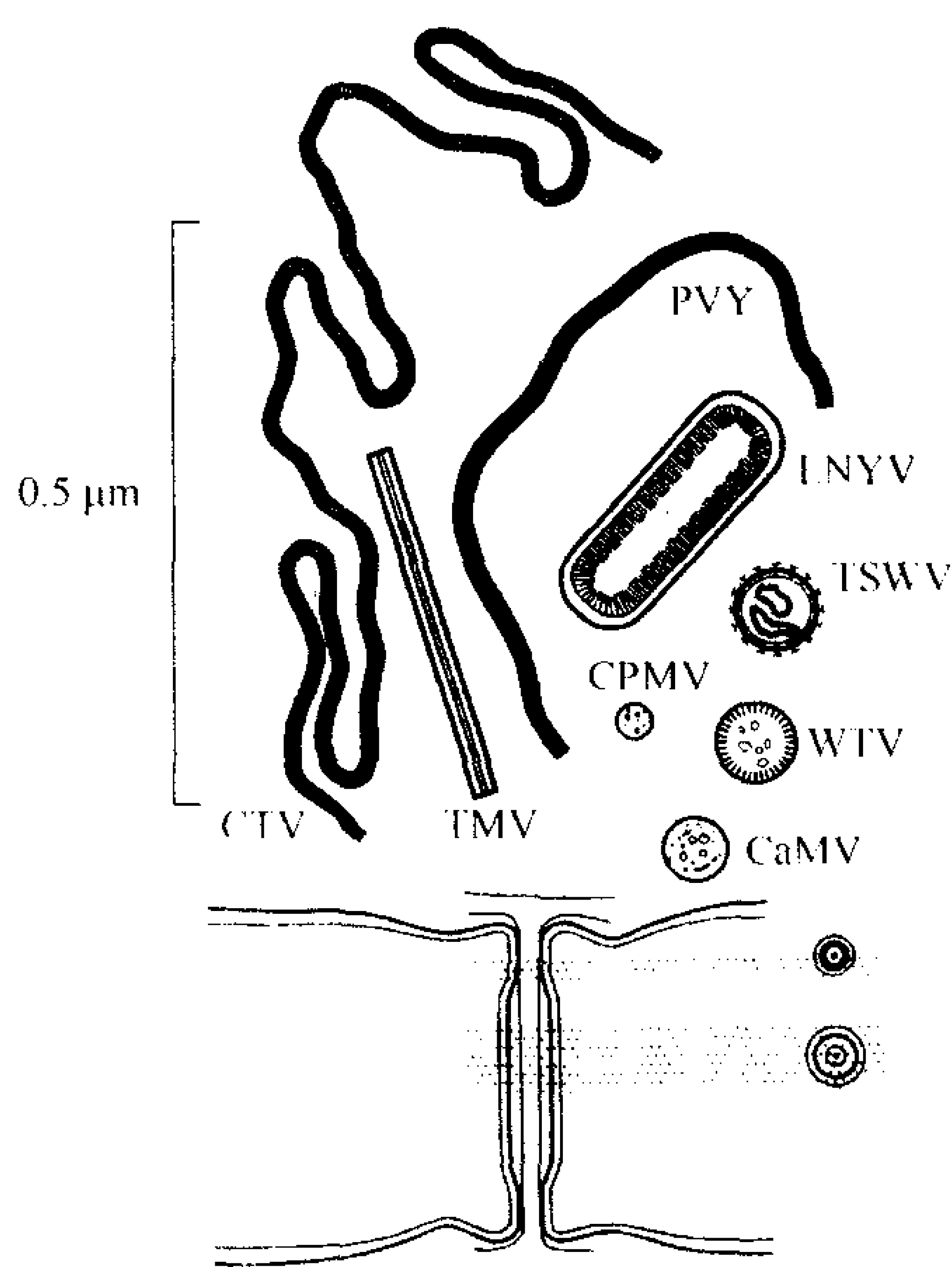


图9.1 与胞间连丝大小相比较的一些植物病毒的相对大小。CTV，2 μm×10 nm；TMV，300 nm×18 nm；PVY，750 nm×11 nm；LNYV，220 nm×80 nm；TSWV，80 nm；WTV，70 nm；CaMV，50 nm；CPMV，28 nm。承蒙版权所有者（Springer-Verlag GmbH and Co. KG）惠允，引自Gibbs（1976）。

在人们认识到病毒在细胞间的移动与病毒复制密切相关时，提出了关于病毒在细胞内移动的一些问题。病毒基因组必须从复制位点移动到相邻细胞的转运位点（胞间连丝）。对在细胞质中复制的病毒而言，必须有细胞骨架因子的参与（参见本章第Ⅱ节D.2.a以及第13章）；在细胞核中复制的病毒，还包括病毒穿过核膜的运输（参见第Ⅱ节C）。

B. 研究病毒移动的方法

随着多种细胞学、分子技术方法的应用，关于病毒移动的信息迅速增加。对此更详细的介绍参见Hull（1989）和Maule（1991）的综述。现将这些方法列举如下。

a. 经典方法

研究病毒移动和分布的经典方法是在接种后不同的时间点将植株切分为适当大小的几部分。然后将这些部分的提取物立即（或经过一个温育期后）接种到适当的测定寄主（assay host）上，使得可能存在的极少量的病毒增加到可以检测的数量（图9.2）。

荧光抗体方法已应用于植株各个部分病毒的检测。当然，这种方法的灵敏度比侵染

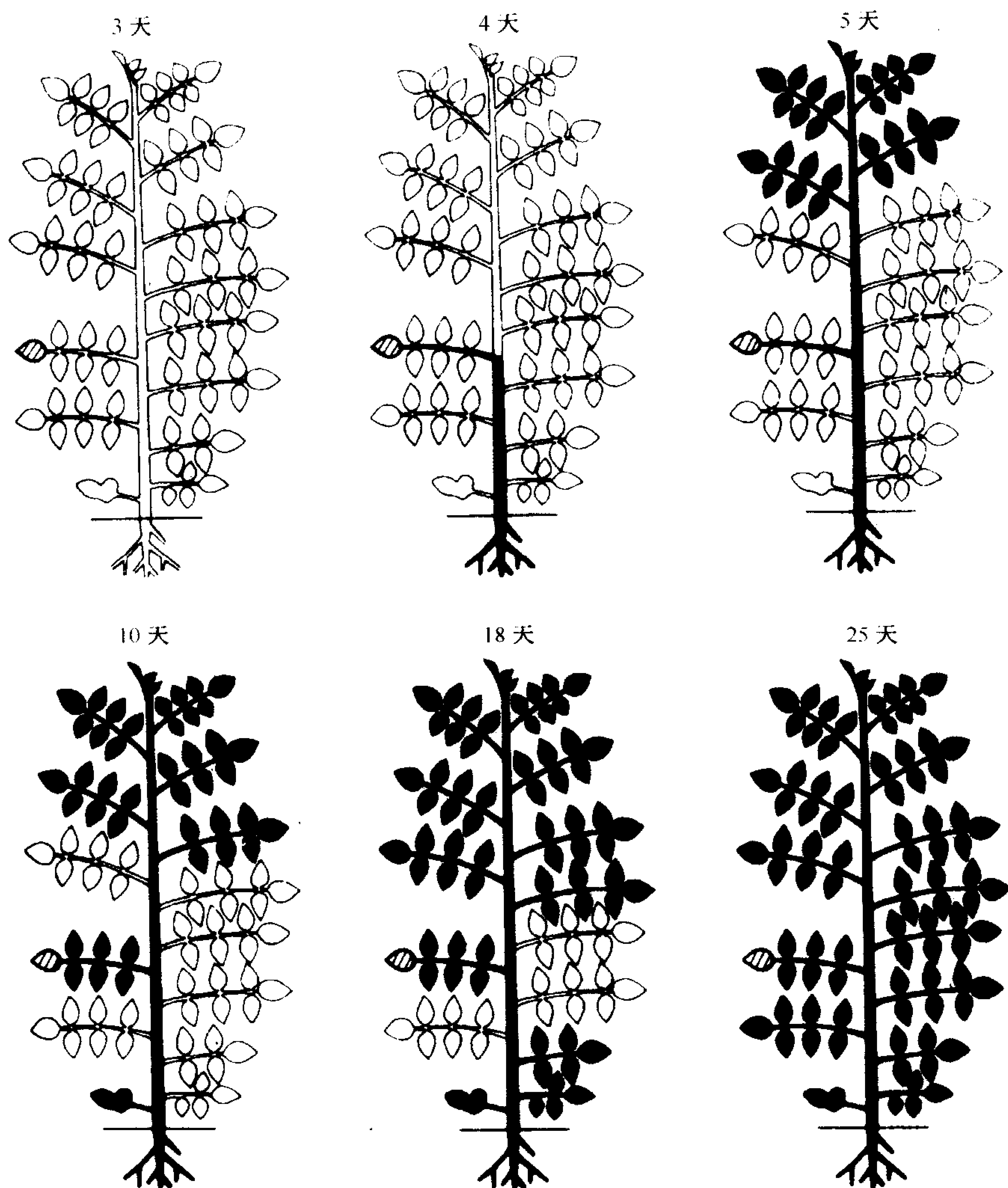


图9.2 TMV在一株幼嫩番茄植株中的扩散时程。左边的接种叶用阴影标记，系统侵染的叶片用黑色显示。经允许，引自 Samuel (1934)。

性方法低，但给出了病毒的确切定位信息。用于分析和诊断病毒的其他各种方法也可用于病毒移动情况的示踪（参见第15章）。

b. 蛋白质表达

分子技术如蛋白质印迹法（Western blotting）可用来确定 MP 表达的时间和组织。已在 *E. coli* 和昆虫细胞中表达 MP 基因来研究 MP 的特性。

c. 组织印迹

将叶片、叶柄或茎的切面压印到硝酸纤维素膜上，然后用蛋白质印迹法显色以揭示有特定蛋白质表达的细胞（Mutterer *et al.*，1999）。

d. 电子显微镜技术

通过利用电子显微镜观察超薄切片和受侵染的原生质体研究受侵染植株的细胞学，

已鉴定了与病毒细胞间扩散相关的各个方面。通过与金标记的抗体结合使用，可以揭示抗原的定位。

e. 病毒基因组标记和突变

病毒侵染性克隆的获得使得病毒的基因组能够被修饰以便插入可表达荧光复合物的基因，从而可以确定病毒的位点或更确切地说标记荧光复合物基因的病毒基因产物的位点。最常用的荧光复合物是来自水母（*Aequoria victorea*）的绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）（Baulcombe *et al.*，1995；Oparka *et al.*，1996；Verver *et al.*，1998）。葡糖醛酸糖苷酶（β-glucuronidase，GUS）也可用作标记（Dolja *et al.*，1992；Schmitz and Rao，1996）。然而，并不是所有标记的病毒基因组的行为都像正常的未标记的一样。例如，PLRV 基因组，用 GFP 标记后侵染本生烟（*Nicotiana benthamiana*），仅在少数细胞中有 GFP 的表达，在系统侵染的组织中的 PLRV 基因组缺失了部分或全部 GFP cDNA（Nurkiyanova *et al.*，2000）。

病毒侵染性克隆的特定位点可以被突变以鉴定对病毒细胞间移动起重要作用的区域，甚至定位到氨基酸。

f. 微注射技术

第 12 章第Ⅰ节 B 描述了用微注射（microinjection）接种病毒的方法。通过注射用荧光复合物基因标记的病毒基因组，可以检测病毒在细胞间的移动。同样地，融合到 MP 基因的 3′端或 5′端的荧光蛋白基因重组体通过微注射，作为体内报道基因（reporter）确定 MP 在受侵染组织、分离的细胞中以及在未发生侵染的组织中瞬时表达的定位。另外一种方法是将用荧光染料（fluorochrome）标记的不同分子半径的葡聚糖（dextran）与病毒或移动蛋白共注射（Wolf *et al.*，1989）。通过利用共焦激光显微术（confocal laser microscopy），结合先进的计算机软件（如三维数字分析包），就可以观测到标记的大分子向临近细胞的移动（Heath，2000）。

但是，在应用微注射技术和解释结果时必须谨慎。Oparka 和 Prior（1992）发现微注射的压力可以导致胞间连丝的关闭。在对两种微注射方法的比较中，Storms 等（1998）比较了转基因表达 TSWV 和 TMV MP 的植株和非转基因植株的胞间连丝的大小排阻限（SEL）。他们发现在两个转基因植物系中，压力介导的不同大小的荧光探针（fluorescent probe）的注射均可导致胞间连丝 SEL 的增加。相反，相同探针的离子渗透（iontophoretic injection）实验结果表明，转基因植株的 SEL 相对于非转基因植株的 SEL 减小了。他们推断 SEL 的增加可能是由于胞间连丝结构的破坏而引起的，因为病毒 MP 的存在会导致逆境（胁迫），而气压又是附加的逆境。

可以将 MP 基因和 GFP 基因融合重组体通过生物射弹轰击（biolistic bombardment）（基因枪）法导入表皮细胞表达融合蛋白并使其移动到相邻的细胞中（Itaya *et al.*，1997）。如果担心在 *E. coli* 中表达和纯化的融合蛋白在植物中不能正确行使功能时可使用这一方法。

g. 表达移动蛋白的转基因植株

利用表达 MP 或突变的 MP 的转基因植株来研究这些蛋白质的功能，为早期研究 MP 提供了一些证据。这些植株还可以产生对病毒的抗性（参见第 16 章第Ⅶ节）。

h. 序列相似性

通过与已知的 MP 序列比较氨基酸相似性已经鉴定了一些 MP。

C. 病毒穿过核膜的运输（Whittaker and Helenius，1998）

在 3 个病毒科成员的复制过程中至少有一个阶段是在细胞核中进行的。双生病毒科（*Geminiviridae*）和矮缩病毒科（*Nanoviridae*）* 成员单链 DNA 基因组的复制和花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）成员双链 DNA 的转录是在核中进行的。这就需要病毒核酸首先输入到细胞核中，随后再输出到细胞质中。

一些双分体的菜豆金色花叶病毒属成员的（begomoviral）DNA 输入和输出是由 BV1（BR1）蛋白介导的（Pascal *et al.*，1994），BV1 蛋白有两个典型的核定位信号（Sanderfoot *et al.*，1996）。这些信号负责核酸向细胞核的输入，但与核酸输出相关的信号尚未得到鉴定。

而单分体的菜豆金花叶病毒属成员和双生病毒科其他病毒属的成员不编码 BV1 的同源物（homolog）。免疫荧光染色表明玉米线条病毒属成员 MSV 的外壳蛋白在细胞核中积累，将一个潜在的核定位信号突变后导致外壳蛋白仅在细胞质中积累（图 9.11）。MSV 外壳蛋白可结合单链 DNA 和双链 DNA，且在共微注射（co-microinjection）时能将这两种形式的核酸转运到细胞核中（Liu *et al.*，1996a；Kotlisky *et al.*，2000）。利用 GUS 融合体，Kunik 等（1998）发现 TYLCV 外壳蛋白在植物和昆虫细胞中均被输入到细胞核中，突变分析表明在该蛋白质的 N 端有一个核定位信号。

如第 6 章（第Ⅴ节 B.1）所述，矮缩病毒科成员基因组包括多个小的环状 ssDNA。通过将 GFP 结合到 BBTV DNA 3、4、6 编码的蛋白质上，Wanitchakorn 等（2000）发现，DNA 3 和 DNA 6 的产物在细胞质和细胞核中均存在。将 DNA 3 和 DNA 6 与 DNA 4 共表达表明，DNA 4 编码的蛋白质能够将 DNA 6 蛋白质重新定位于细胞周边，但不能重新定位 DNA 3 蛋白质。这暗示着 DNA 6 蛋白质是一个细胞核穿梭蛋白，类似于双生病毒科成员。

通过瞬时表达 CaMV 外壳蛋白在其 N 端区域鉴定了一个核定位信号（Leclerc *et al.*，1999）。该信号暴露在病毒粒体表面，并由外壳蛋白前体（precapsid）（可阻止核定位）的 N 端调控。这种调控被认为对于病毒在细胞质中的装配是重要的。

现已发现一些 RNA 病毒或其产物与细胞核相关。PEMV（参见第 8 章第Ⅳ节 L.4）、SBMV（De Zoeten and Gaard，1969b）以及侵染植物的弹状病毒（参见第 5 章第Ⅷ节 A）的病毒粒体位于细胞核内或与细胞核有联系。TCV 的两个蛋白质，8 kDa 和9 kDa蛋白质，参与病毒的细胞间移动（参见 D.2.g 部分）。用 GFP 标记的 8 kDa 蛋白质定位于细胞核中（Cohen *et al.*，2000），并且该蛋白质含有两个核定位信号。突变其中的一个定位信号均不能影响核定位，但两个定位信号全突变后就影响到核定位。但是，这些突变均不影响 TCV 的细胞间移动。

---

* 原文为 *circovirus* ——译者注。

D. 细胞间移动

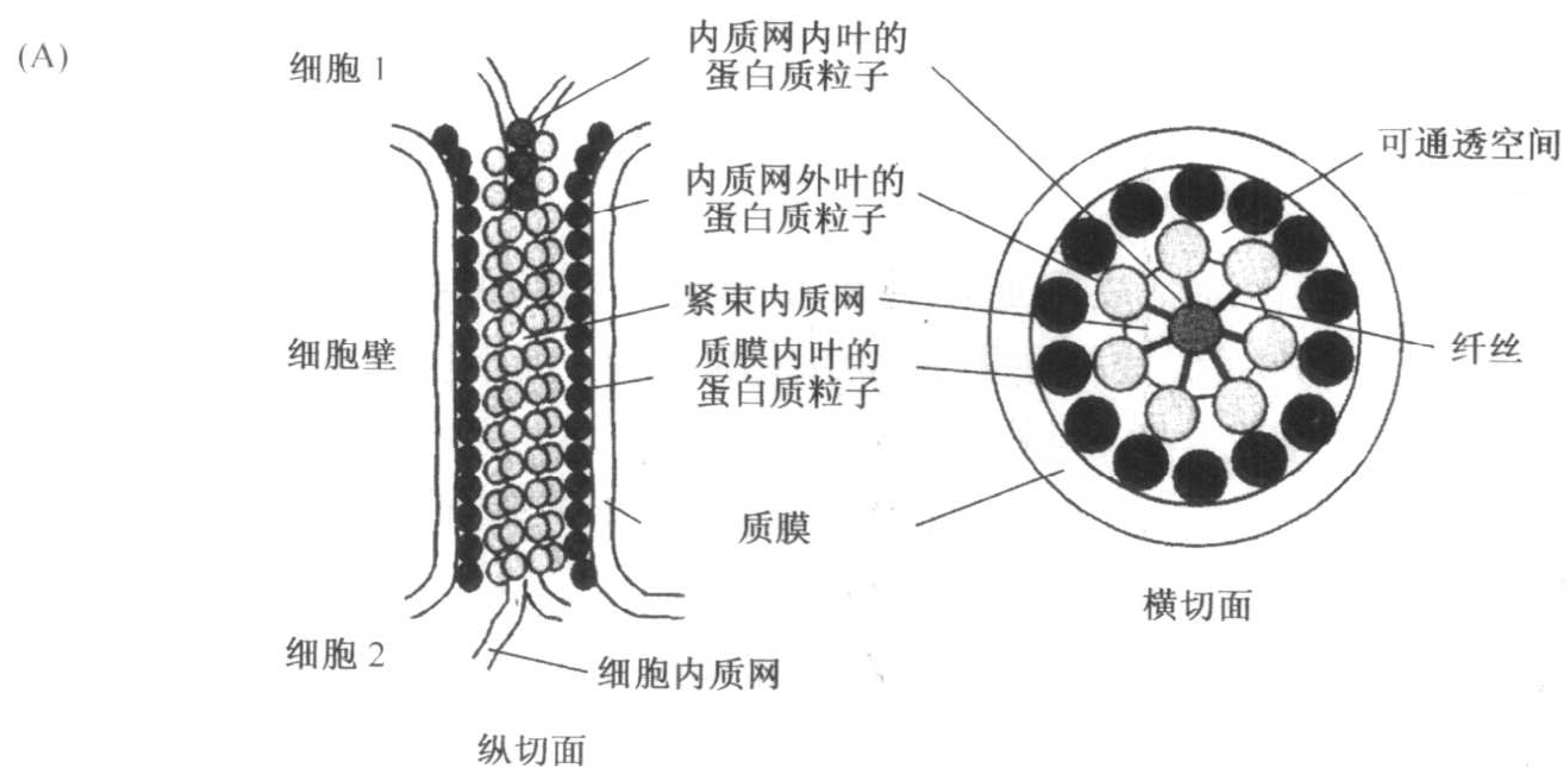
1. 胞间连丝

胞间连丝形成了植物细胞之间通讯的重要通道。它们调控细胞间的通讯（cell-to-cell communication），进而促成植物器官和组织的分化。胞间连丝的结构、形成频率以及 SEL 的发展变化能导致共质体域（symplastic domain）的建立，所有细胞的代谢和功能在共质体域中可能是同步进行的。因为胞间连丝插入到细胞壁，它们是不能通过研磨植物材料和分级分离来提纯的少数植物细胞器之一。因此，对它们的研究大部分是通过电子显微镜技术进行的。胞间连丝与病毒的相互作用不仅增加了研究它们的兴趣而且提供了深入了解其结构和功能的条件。

Overall 和 Blackman（1996）、Ghoshroy 等（1997）、Ding（1998）和 Aaziz 等（2001）综述了关于胞间连丝结构的近期观点。胞间连丝的基本结构包括两个同心的膜圆柱体、质膜以及穿过相邻植物细胞纤维素壁的内质网（紧束的 ER 即连丝微管，desmotubule）（图 9.3）。两个膜圆柱体间的环面（annulus）连接两个细胞间的细胞溶质。高分辨率电子显微镜揭示了在质膜和紧束的 ER 内含有直径约 3 nm 的蛋白质颗粒，这些颗粒由辐条状延伸结构连接。据认为这些蛋白质颗粒间的空隙形成直径约 2.5 nm 的曲折微通道。通过注射多种分子直径的染料表明这些微通道有一个基本的 SEL，只允许约 1 kDa 大小的分子被动扩散。

胞间连丝有多种类型（Nelson and van Bel，1998）。在一个新细胞壁中形成简单的初生胞间连丝，然后经过修饰后形成具有分支通道和一个具有显著中央腔的复杂结构（次生胞间连丝）（Ding *et al.*，1992；Itaya *et al.*，1998）。随着叶片的延伸生长，次生胞间连丝以由上往下的模式形成，在转基因植株中，表达的 TMV MP 就定位于这些胞间连丝中（Ding *et al.*，1992）。对病毒的移动途径应特别注意在维管束鞘和韧皮部薄壁细胞间的胞间连丝、韧皮部薄壁细胞和伴胞间的胞间连丝，以及伴胞（或中间细胞）（Turgeon *et al.*，1993）和区分不同组织边界的筛分子间的胞间连丝中的移动，至少有部分病毒是通过这样的途径移动的（图 9.16）。维管束鞘和韧皮部薄壁细胞间的胞间连丝不同于叶肉细胞间的胞间连丝，因为在一些病毒进入侧脉的韧皮部时前者需要额外修饰（Ding，1998；Derrick and Nelson，1999）。个别病毒的系统侵染，如 TAV（Thompson and Garcia-Arenal，1998），是受维管束鞘/维管束的界面（interface）控制的，如同 BMV 在单子叶植物中（Ding *et al.*，1999）和 RCNMV 在一些寄主中的情况一样（Wang *et al.*，1998b）。限制于韧皮部的病毒（如黄症病毒）不能由维管束鞘移动到叶肉细胞（见下文），也显示了这种组织边界（tissue boundary）的隔离作用。已观察到数种病毒可以侵染许多韧皮部薄壁细胞，但受侵染的伴胞很少（Ding，1998）。伴胞和筛分子之间的胞间连丝有一个特殊的结构：筛分子壁上有一个单一的孔，而相连的伴胞壁上有分支状排列（van Bel and Kempers，1997）。连接伴胞和筛分子之间的 SEL 大于 10 kDa（Kempers and van Bel，1997）。

Wolf 等（1989）进行的最初试验利用染料偶联的右旋糖苷微注射表明叶肉细胞间未修饰的胞间连丝的 SEL 为 0.75～1.0 kDa，TMV MP 可以将其增加到 9.4～



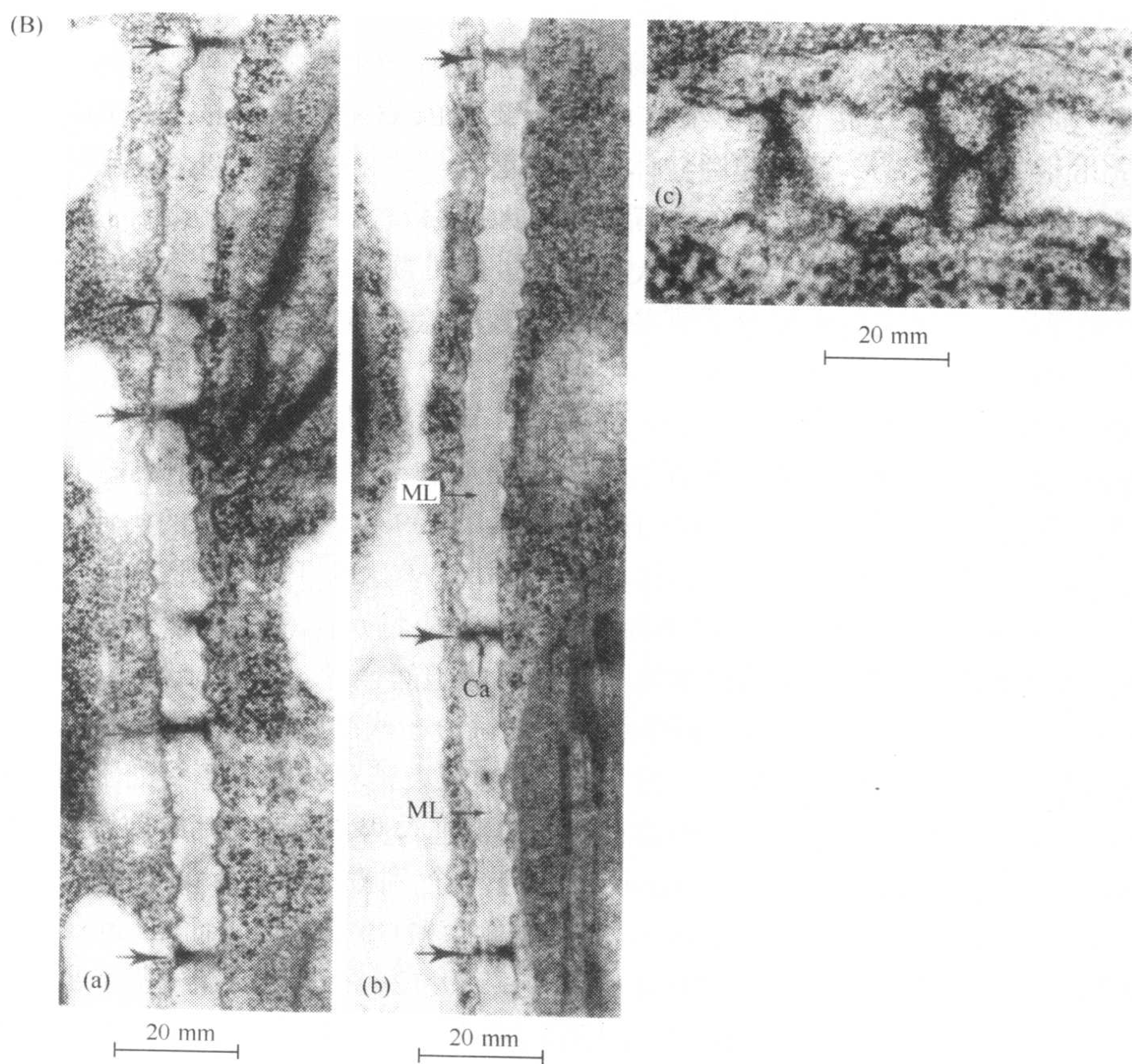


图9.3　胞间连丝的结构。(A)一个简单的胞间连丝的结构。承蒙版权所有者(© Annual Reviews: www.AnnualReviews.org)惠允。引自 Ghoshroy 等(1997)。(B)烟草胞间连丝超微结构细节。(a)和(b)分别为第一片叶基部和叶尖叶肉细胞间初生胞间连丝(未标记的箭头),注意在叶尖胞间连丝已形成的中央腔(ca)。ML,胞间层(middle lamella)。(c)第一片叶尖部的叶肉胞间连丝,有一个明显较复杂的结构。比例尺:(a) 408 nm;(b) 466 nm;(c) 140 nm。经允许,引自 B. Ding 等(1992)。

17.2 kDa (图 9.4)。

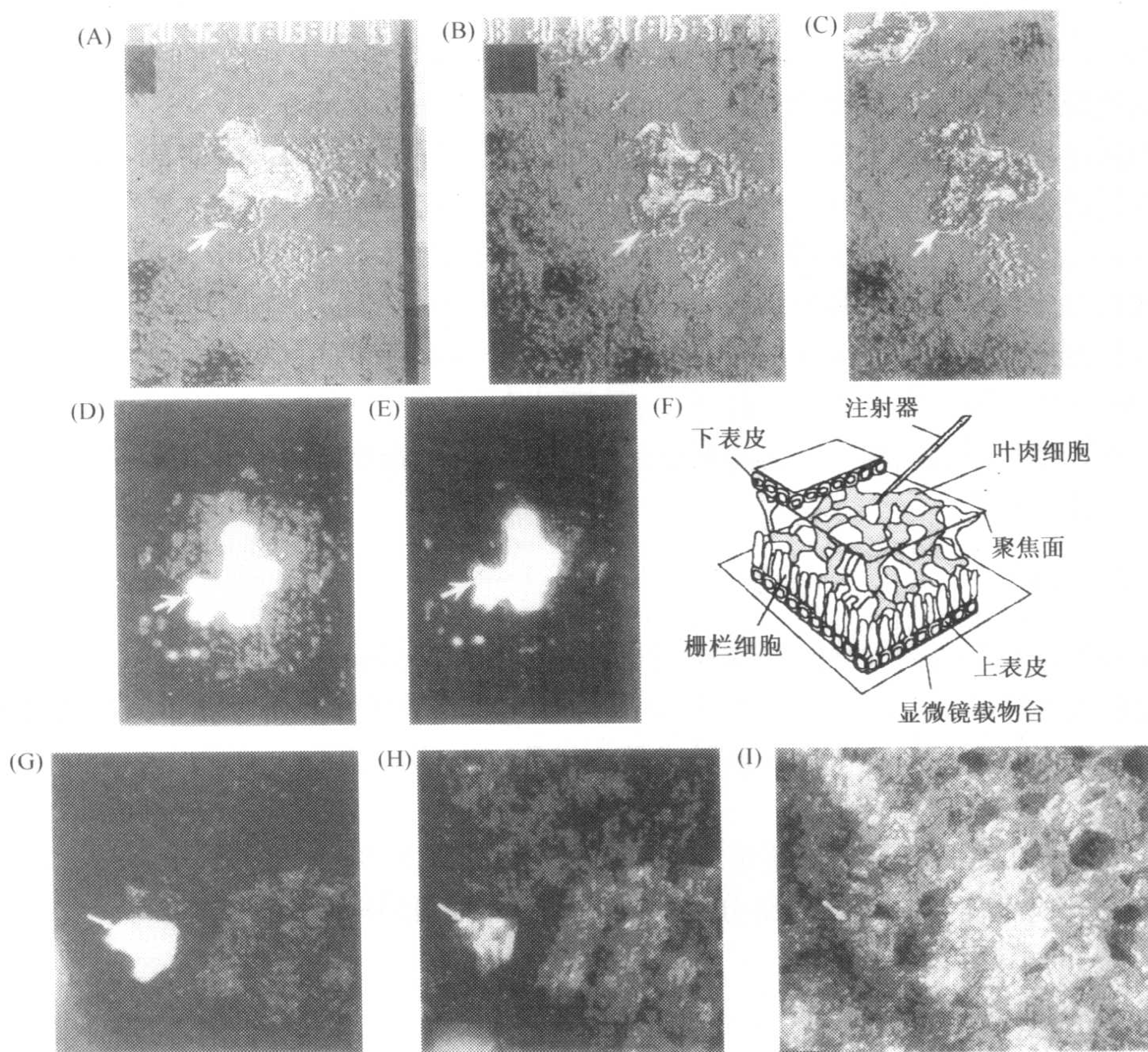


图9.4 （见彩色图版9.1）荧光标记的10 kDa荧光黄(4-氨基苯邻二甲酰亚胺)葡聚糖[(A)～(E)]或20 kDa荧光素异硫氰酸标记的葡聚糖[(G)～(I)]，与TMV MP[(A)～(C)，(G)～(I)]或不与TMV MP[(D)，(E)]一起微注射入成熟烟草叶片的海绵状叶肉细胞。放大倍数：(A)～(C)，×230；(D)和(E)，×130。图中显示了10 kDa葡聚糖移动的时间过程。注射后时间：(A)1 min；(B)4 min；(C)5 min；(D)1 min；(E)30 min；(G)3 min；(H)14 min；(I)34 min。箭头指向被注射的细胞。图像被调和：颜色是从假色成像中提取，代表从蓝(最低亮度)到白(最高亮度)的荧光信号亮度，黑色和蓝色代表背景；(A)中荧光图形的右侧标示了颜色标条。图像的顶部是自动计时器给出的试验的日期和时间。在图(C)中，计时器被关掉以便于更好地观察荧光细胞。(F)穿过番茄叶片的示意图。叶肉细胞形成了一个三维相互连接的网络。为了注射叶肉细胞，削去一小部分叶片下表皮(5 mm^2)。叶片平放在显微镜镜台上，远轴端向上。仅仅注射焦点平面内的表面细胞，随后进行观测。这些细胞以更亮的模式标示。承蒙版权所有者(© The National Academy of Sciences, USA)惠允，引自Waigmann等(1994)。

上述观点在其后的几年中被视为胞间连丝的SEL法则，但近来的观测发现未经修饰的胞间连丝的SEL也有很大的差别。例如，克利夫兰烟（*Nicotiana clevelandii*）毛状体（trichome）的胞间连丝基本SEL约为7 kDa（Waigmann and Zambryski，1995），这可能归因于不同的结构（Waigmann *et al.*，1997）。而且，已清楚的是，在叶片中光合作用同化产物生产与利用的库-源转换（sink-source transition）期间，胞间连丝的通透性会发生很大变化，大到60 kDa的分子也能够进入发育着的库细胞中（Oparka *et*

al.，1999）。胼胝质周转（callose turnover）被认为是自然调控胞间连丝 SEL 的因子之一。β-1,3-葡聚糖酶缺陷型的烟草突变体，在遇到升温、激发子和伤害时胼胝质积累增加，也表现出数种病毒移动的滞后（Inglesias and Meins，2000）。

胞间连丝在细胞壁上成群出现，一定不能认为一群中的胞间连丝都是一样的。同样地，它们随着时间在变化，也可能随条件而变化，如病毒侵染。Shalla 等（1982）发现 TMV *ts*（温敏）突变体在烟草叶片中移动受限是与胞间连丝数目的大幅度减少相关的。在植物形态建成过程中，共质体域（symplastic domain）是通过胞间连丝将原生质体结合在一起而形成的（Ehlers *et al*.，1999）；有可能在多种不同的时间点和其他条件下，叶片中的共质体域是在变化（或移动）的。

因此，植物细胞间相互联络的系统是动态的，并且随着对共质体系统的不同功能的需求而变化。

2. 移动蛋白

病毒编码移动蛋白（MP）的第一个证据来自于 Nishiguchi 及其同事（1978）的研究，他们发现 ToMV 在其寄主中的移动能力对温度的敏感性并未因病毒复制而受到任何影响，从而鉴定了烟草花叶病毒属成员 30 kDa 的 MP。其后，在许多病毒中均鉴定出了 MP。

迄今已提出多种标准用于鉴定或证明病毒基因产物为 MP。这些标准包括：

- 多组分病毒中一个核酸组分的丢失导致病毒细胞间移动的丧失；
- 一个病毒基因的诱变；
- 病毒间移动功能的互补；
- 序列比较；
- 与胞间连丝相关联的基因产物的免疫检测。

下面将要讨论的病毒的基因组组构见第 6 章；其表达见第 7 章。

a. TMV “30K” 蛋白质（Citovsky，1999；Rhee *et al*.，2000）

TMV 30 kDa 蛋白质（P30）被鉴定为 MP 的过程如下：在限制性温度下，温敏突变体（temperature-sensitive mutant）Ls1 能够在单个细胞内复制，但不能移动出最初侵染的细胞（Nishiguchi *et al*.，1978，1980），Ls1 的缺陷定位于 P30（Ohno *et al*.，1983），且在转 P30 基因的植株中于非（移动）许可条件下可以通过互补实现移动（Deom *et al*.，1987；Meshi *et al*.，1987）。从那时起，对这一蛋白质进行了详细研究，发现它结合单链核酸（Citovsky *et al*.，1990），在病毒侵染的植株和转基因植株中约定位于胞间连丝（Tomenius *et al*.，1987；Atkins *et al*.，1991b）（图 9.5），能够增加胞间连丝的 SEL（Wolf *et al*.，1989；Waigman *et al*.，1994）（图 9.4），且被一种受发育调控的与细胞壁相伴随的蛋白激酶磷酸化（Atkins *et al*.，1991a，b；Watanabe *et al*.，1992；Citovsky *et al*.，1993；Haley *et al*.，1995）。

用原子力显微术（atomic force microscopy）研究表明 P30 结合 RNA 链的所有部分（Kiselyev *et al*.，2001）。P30 与胞间连丝的结合是由紧靠 N 端的氨基酸控制的（Boyko *et al*.，2000c）。

因为发生磷酸化的 P30 量太少而难以进行纯化和分析，Citovsky 等（1993）利用

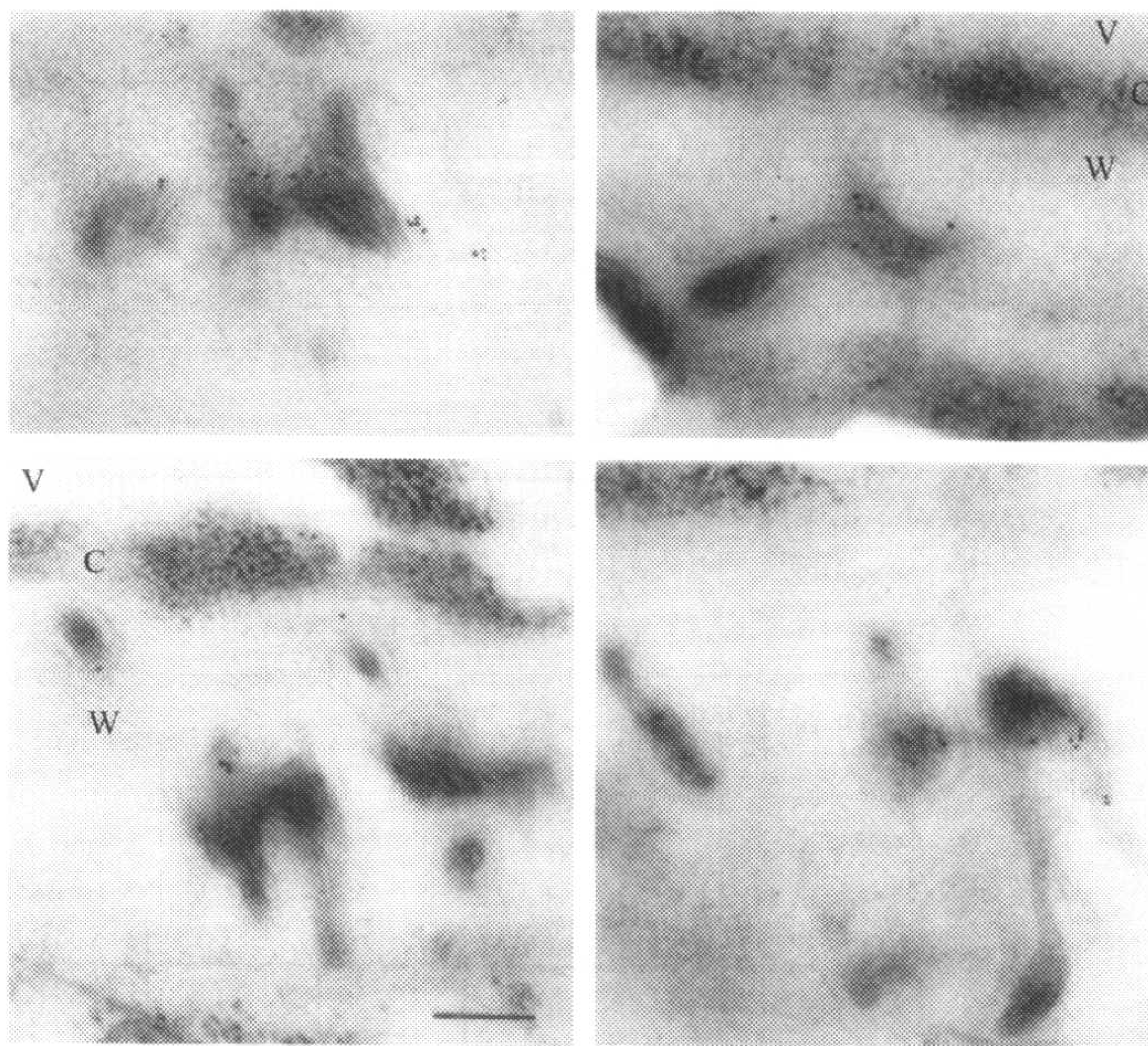


图9.5 表达 TMV MP 的转基因烟草植株(277株)叶片细胞壁中的胞间连丝的代表性电镜照片。材料未经锇酸固定处理(osmicated)以保存其抗原性,因此,对比度较低,尤其在膜中更是如此。MP 的免疫金标记表明金颗粒定位于胞间连丝上。信噪比(signal-to-noise ratio)高,有少量可忽略不计的金颗粒存在于细胞壁、液泡和其他细胞器上。V,液泡;C,细胞质;W,壁。标线=200 nm。经允许,引自 Atkins (1991b)。

体外系统确定了发生磷酸化的位点是该蛋白质 C 端的 Ser-258、Thr-261 和 Ser-265。Matsushita 等 (2000) 发现了一种细胞激酶,可对紧密结合在固定的 ToMV P30 的部分或全部 C 端残基进行磷酸化。但是,突变分析表明 ToMV P30 的 Ser-37 和 Ser-238 被磷酸化,第 37 位氨基酸对 ToMV 侵染性和在原生质体中的定位是相当重要的 (Kawakami *et al.*, 1999)。这些报道的差别是否因研究所采用的(密切相关的)病毒的不同、使用的系统不同,还是其他因素所致尚不清楚。磷酸化和(或)Ser-37 的存在对 ToMV P30 的胞内定位是必需的 (Kawakami *et al.*, 1999)。TMV P30 对胞间连丝转运的调控可能以寄主依赖方式取决于 C 端的 Ser-258、Thr-261 和 Ser-265 三个氨基酸的磷酸化 (Waigmann *et al.*, 2000)。磷酸化位点被带负电荷氨基酸替换的突变体不能在普通烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中进行细胞间扩散,但在本生烟 (*N. benthamiana*) 中则可以扩散。

P30 的核酸结合特性可将核酸二级结构解开,产生非常细长的核蛋白复合体(直径为 1.5~2.0 nm) (Citovsky *et al.*, 1992)。烟草花叶病毒属成员的 P30 保守区以及与其活性相关的区域已被定位 (Saito *et al.*, 1988; Waigman *et al.*, 1994)[图 9.6 (A)]。

P30 也与细胞骨架结构有联系。在利用 P30 抗体和 GFP 融合到 P30 的 TMV 侵染性克隆的实验中,在原生质体和整株植物中均发现 P30 定位于微管中 (Heinlein *et al.*,

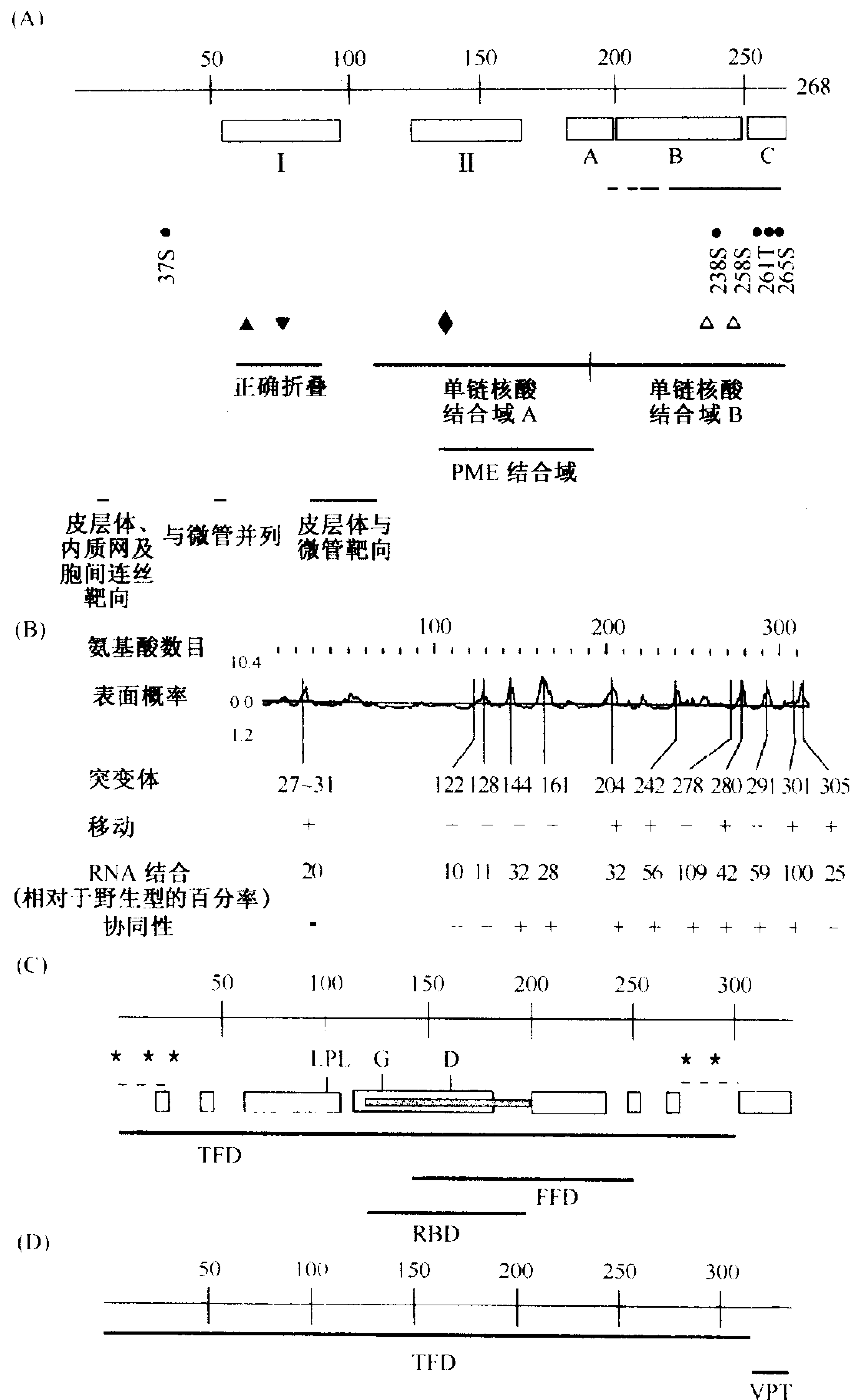


图 9.6　移动蛋白上功能域的示意图。(A) TMV P30。最上面一条线表示基因产物，并标明了氨基酸位置。第二行的方框Ⅰ和Ⅱ代表同源区，A 和 C 为酸性氨基酸，B 为碱性氨基酸。由 Saito 等（1988）鉴定。第三行表示 C 端缺失后对细胞间移动的影响，完整的线表示没有影响，稍长线表示对细胞间移动有轻微影响，短线表示影响较大，没有线表示移动丧失（Gafney *et al.*，1992）。再下一行的黑点表明正文中讨论的磷酸化氨基酸的位置。再下一行的三角表明在克服 Tm2 抗性的株系中各种残基的位置：▼表示株系 Ltb1，▲表示 C52，△表示克服 Tm2² 抗性的株系。再下一行显示 Citovsky 等（1992）鉴定的功能域。再下一行显示 PME 结合域（Chen *et al.*，2000）。底线是 Kahn 等（1998）和 Boyko 等（2000c）鉴定的功能域。(B) RCNMV 移动蛋白的功能域。最上一行标明了基因产物，附有氨基酸位置。第二行表示用丙氨酸扫描氨基酸突变位置预测的表面概率（surface probability）。底部 3 行分别代表这些突变对细胞间移动、RNA 结合以及协同性的影响。(C) CaMV 移动蛋白中的功能域。最上一行标明基因产物，并标有氨基酸位置。第二行是 Thomas 和 Maule（1995b）对与花椰菜花叶病毒属其他成员主要的序列保守区进行的缺失分析的结果，空方框表示保守区，阴影框表示 RNA 结合区；N 端（点），高变间隔区（短线），有活性的扫描缺失突变位置（星号）以及保守的 LPL 和 G 框、D 框均被标明。下面是 Huang 等（2000）分析的结果，分别标明连丝微管形成域（TFD）、RNA 结合域（RBD）以及荧光焦点形成域（FFD）。(D) CPMV 48 kDa 移动蛋白的功能域。最上一行标明基因产物及其氨基酸位置；下面是 Lekkerkerker 等（1996）鉴定的区域，TFD、VPT 被认为是参与将病毒粒体插入到连丝微管的区域。经允许，引自 Bertens 等（2000）。

1995)。Boyko 等（2000c）发现 P30 与微管的联系是由 C 端 66 个氨基酸引起的。现已发现 P30 还定位于肌动蛋白纤维，在体外试验中，P30 与肌动蛋白和微管蛋白结合（McLean *et al.*，1995）。然而，在侵染后期的细胞中观察到 P30 与微管的联系，但在病毒细胞间移动发生的扩展侵染点的前沿不能观察到这种联系（Boyko *et al.*，2000a）。TMV RNA 的细胞间移动是温度依赖性的，在高温下有更高的效率。这与早期侵染中 P30 与微管的联系增加是一致的（Boyto *et al.*，2000a）。利用 P30 抗体以及将 GFP 基因与 P30 基因融合的 TMV 侵染性克隆还发现 P30 与皮层内质网相联系（Heinlein *et al.*，1998；Reichel and Beachy，1998）。

Mas 和 Beachy（2000）利用微管在低温下被破坏这一事实探索了 P30 与微管相联系的动力学。在侵染原生质体的早期阶段，低温处理引起与 GFP 融合的 P30 在位于核周区的病毒大型复制体（replication body）中的积累。在侵染的中间阶段，低温（4℃）处理破坏了 P30 与微管的联系。将原生质体升温至 29℃又重新建立了 P30 和复制体与微管的联系，导致随后复制体扩散布满整个细胞质和细胞的周围。P30 的一个突变体，TAD5，其第 49～51 位氨基酸缺失，可与内质网相联系但与微管没有联系（Kahn *et al.*，1998）。可以得出的结论是微管的作用是使 P30 在细胞内的分布处于细胞中的外围位点。第 13 章将深入讨论这一问题。

P30 还与从烟草叶片细胞壁分离出的果胶甲基酯酶（pectin methylesterase，PME）相互作用（Chen *et al.*，2000）。通过缺失突变分析鉴定了 P30 中的相互作用区，并表明 PME 结合区对 TMV 在细胞间的移动是必需的。

应用圆二色谱学（circular dichroism spectroscopy）发现了大肠杆菌中表达的 P30 在尿素和 SDS 存在时有约 70%的 α 螺旋构型。P30 有两个抗胰蛋白酶的疏水区，形成一个紧密填充的核心域。基于这些发现，Brill 等（2000）提出了 TMV P30 的拓扑结构（图 9.7）。

b. RCNMV

RCNMV 基因组为双组分，RNA 1 产物负责产生阈下侵染，RNA 2 编码一个 35 kDa蛋白质，使得病毒可以系统侵染植物。因此，这个 35 kDa 蛋白质被鉴定为 MP（Lommel *et al.*，1988）。该蛋白质在体外协同地结合单链核酸，定位于细胞壁组分中，能够增加胞间连丝的 SEL，并将 RNA 从一个细胞转运到另一细胞（Osman and Buck，1992；Osman *et al.*，1992；Fujiwara *et al.*，1993）。在这个 35 kDa 蛋白质中鉴定出了 3 个功能域（Giesman-Cookmeyer and Lommel，1993）：一个 RNA 结合域，一个协同 RNA 结合域，一个体内细胞间移动所需的功能域［图 9.6（B）］。在这些特性方面，RCNMV MP 类似于 TMV MP，但是这两个蛋白质的氨基酸序列相似性比较低。然而，它们在彼此的功能上是互补的，表明它们在功能上是同源的（Giesman-Cookmeyer *et al.*，1995）。据推测，它们具有相似的二级结构（图 9.8）。

c. CPMV

CPMV，豇豆花叶病毒属（*Comovirus*）的其他成员以及线虫传多面体病毒属（*Nepovirus*）成员的 MP 是由 RNA 2 编码的，通过突变分析已确定其为自 RNA 2 表达的多聚蛋白的 58～48 kDa 产物（Wellink and van Kammen，1989）（CPMV 基因组组构见图 6.18 和图 7.28）。用电子显微镜观察 CPMV 侵染的植物材料，发现胞间连丝的

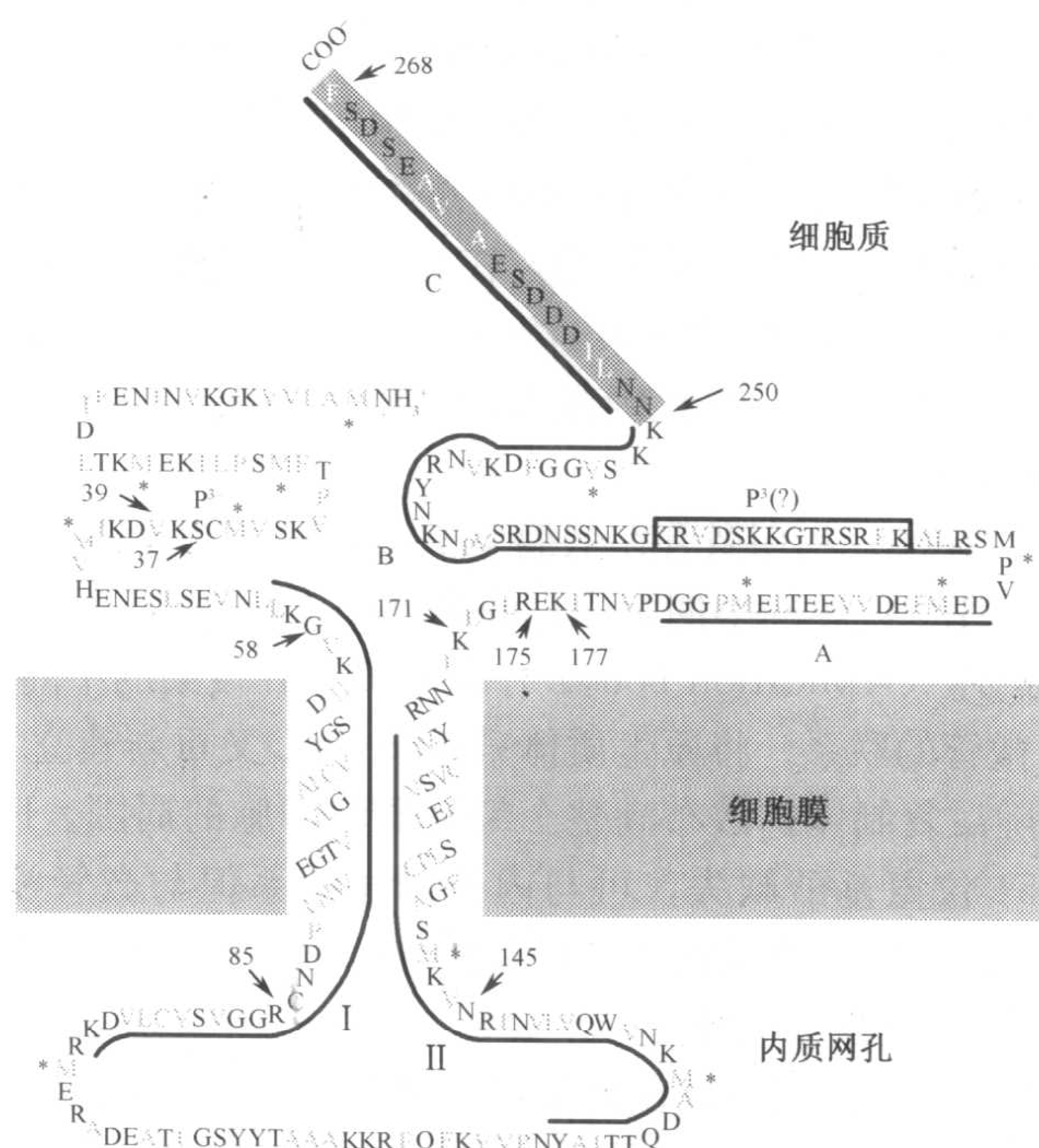


图9.7 （见彩色图版9.2）TMV MP的拓扑结构模型。氨基酸序列是从编码该MP的ORF推断的。疏水性氨基酸用黄色表示，碱性氨基酸用蓝色表示，酸性氨基酸用红色表示，半胱氨酸用绿色表示。抗胰蛋白酶的核心区由前249或250残基组成。C端（灰色）可以被胰蛋白酶迅速降解掉。区域Ⅰ（残基56～96）和区域Ⅱ（残基125～164）是烟草花叶病毒MP的保守区，用黑色线描出；区域A（残基183～200）和区域C（残基252～268）是酸性的，用红色线描出；区域B（残基206～250）是碱性的，用蓝色线描出。细胞质区域、跨膜区、ER腔以及核心区域是从用蛋白酶K处理的微粒体（microsome）的Western印迹、疏水性分析、荧光显微术、对胰蛋白酶的敏感性以及质谱分析推断的。据认为跨膜区为α螺旋。单体（monomer）和核心（core）之间的疏水肽的长度（38～85对58～85）不同表明单体的C端可能与其N端相互作用。基于Prosite程序预测和在烟草花叶病毒属成员中进行序列保守性分析，第37位丝氨酸发生磷酸化（P^{3-}），第218位丝氨酸也可能发生磷酸化（P^3?）。已报道甲硫氨酸（Met）残基（*）参与蛋白质间的相互作用。承蒙版权所有者（The National Academay of Sciences，USA）惠允，引自Brill等（2000）。

结构发生改变（Kasteel，1999），并且很特别的是，包含病毒粒子的细管（tubule）（直径35 nm）替代了在胞间连丝中正常存在的连丝微管。与58～48 kDa蛋白质抗血清反应的相似的细管，也存在于CPMV侵染的豇豆原生质体的表面（van Lent *et al.*，1991）（图9.9），并存在于用杆状病毒（baculoviruses）载体表达该蛋白质的昆虫细胞中（Kasteel *et al.*，1996）。这些细管最长可达50 μm，直径35 nm，并被质膜包被。通过诱变分析，已发现组成细管的是58～48 kDa蛋白质的48 kDa部分（moiety），没有证据表明有寄主蛋白质的参与（Kasteel，1999）。该48 kDa蛋白质的功能域结构见图9.6(D)。

d. CaMV

CaMV MP为一个38 kDa蛋白质，是通过突变ORF Ⅰ后再分析其产物（P1）鉴定的（Thomas *et al.*，1993）。类似于豇豆花叶病毒属和线虫传多面体病毒属成员，

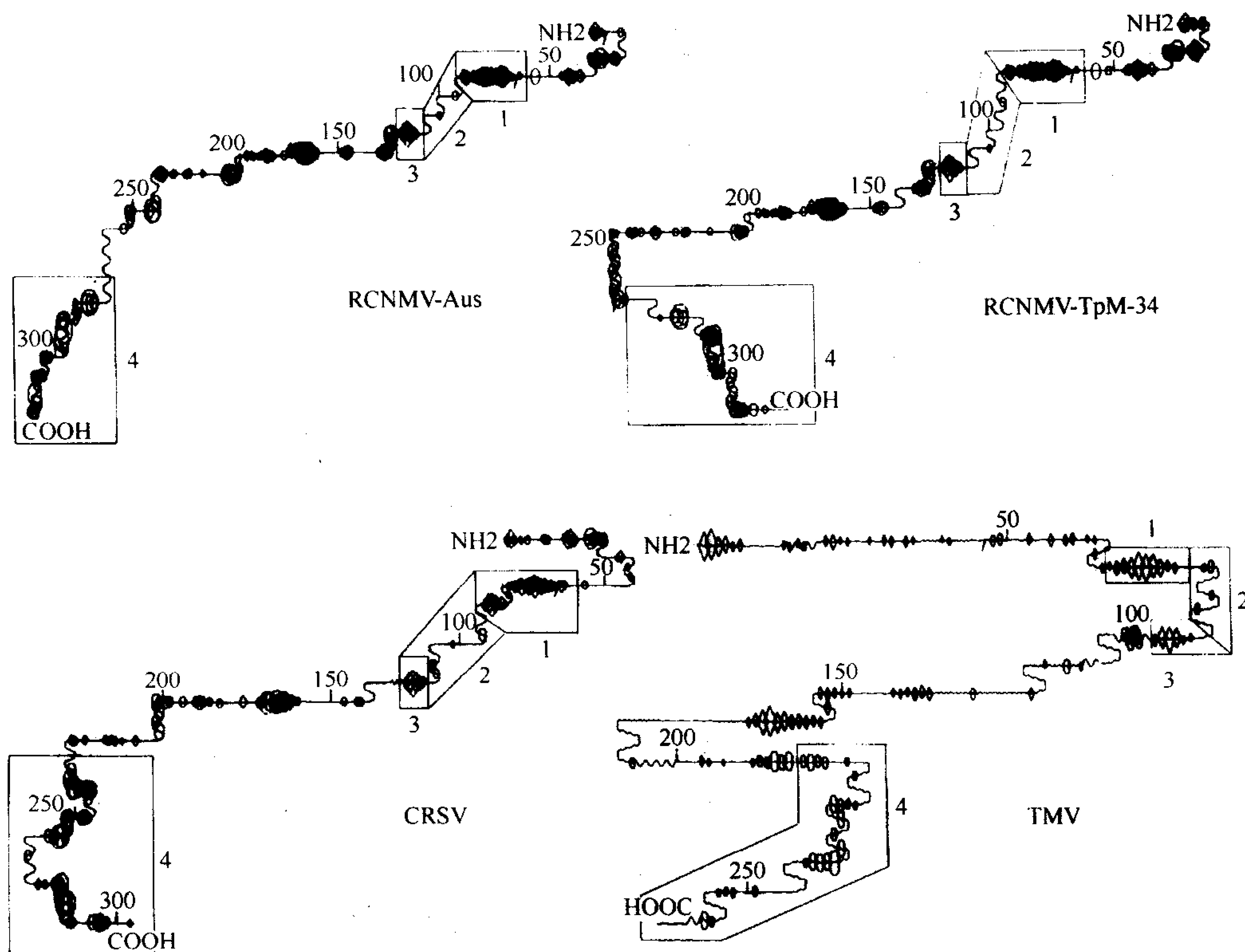


图9.8 以"绘图结构"(Plotstructure)软件做出的对香石竹病毒属成员 CRSV、RCNMV-Aus 和-TpM-34以及TMV 移动蛋白的二级结构预测。二维螺旋图以正弦波、具有锐利锯齿波的β折叠、180°转角和具有钝锯齿波的卷曲表示。在波形图上,以菱形代表疏水残基,以六角形代表亲水残基。符号的大小代表疏水性或亲水性程度。具有相同数字的方框区域表示在比较的4个移动蛋白中保守的结构域。经允许,引自 Kendall 和 Lommel(1992)。

CaMV 侵染也产生穿过胞间连丝的细管（tubule）而使胞间连丝得到修饰（图 9.10）。在 CaMV 侵染的原生质体和昆虫细胞表面也发现有细管（tubule）[图 9.9（C）]（Kasteel *et al.*，1996）。细胞骨架组装抑制剂不影响细管结构，但能破坏植物细胞内膜（endomembrane）系统的布雷菲德菌素 A（brefeldin A）能够干扰细管（tubule）的形成（Huang *et al.*，2000）。CaMV P1 在体外具有核酸结合活性（Citovsky *et al.*，1991；Thomas and Maule，1995a）。通过丙氨酸分区诱变法（alanine scanning mutagenesis）、表位附加（epitope tagging）、与花椰菜花叶病毒属其他成员的序列比较、对植物侵染性以及在昆虫细胞中表达 P1，Thomas 和 Maule（1995b）以及 Huang 等（2000）已阐明了 CaMV MP 的功能域［图 9.6（C）］。表位附加表明该蛋白质的 N 端出现在细管的外表面，C 端在内表面；他们提出 C 端可能是被一个其上游的高变间隔区序列（hypervariable spacer sequence）伸进细管的腔内。

SbCMV 的 MP 是由 ORF 1a 编码的（基因组组构见图 6.1）（Takemoto and Hibi，2001）。

e. 雀麦花叶病毒科

AMV、雀麦花叶病毒属成员、黄瓜花叶病毒属成员以及等径不稳环斑病毒属成员

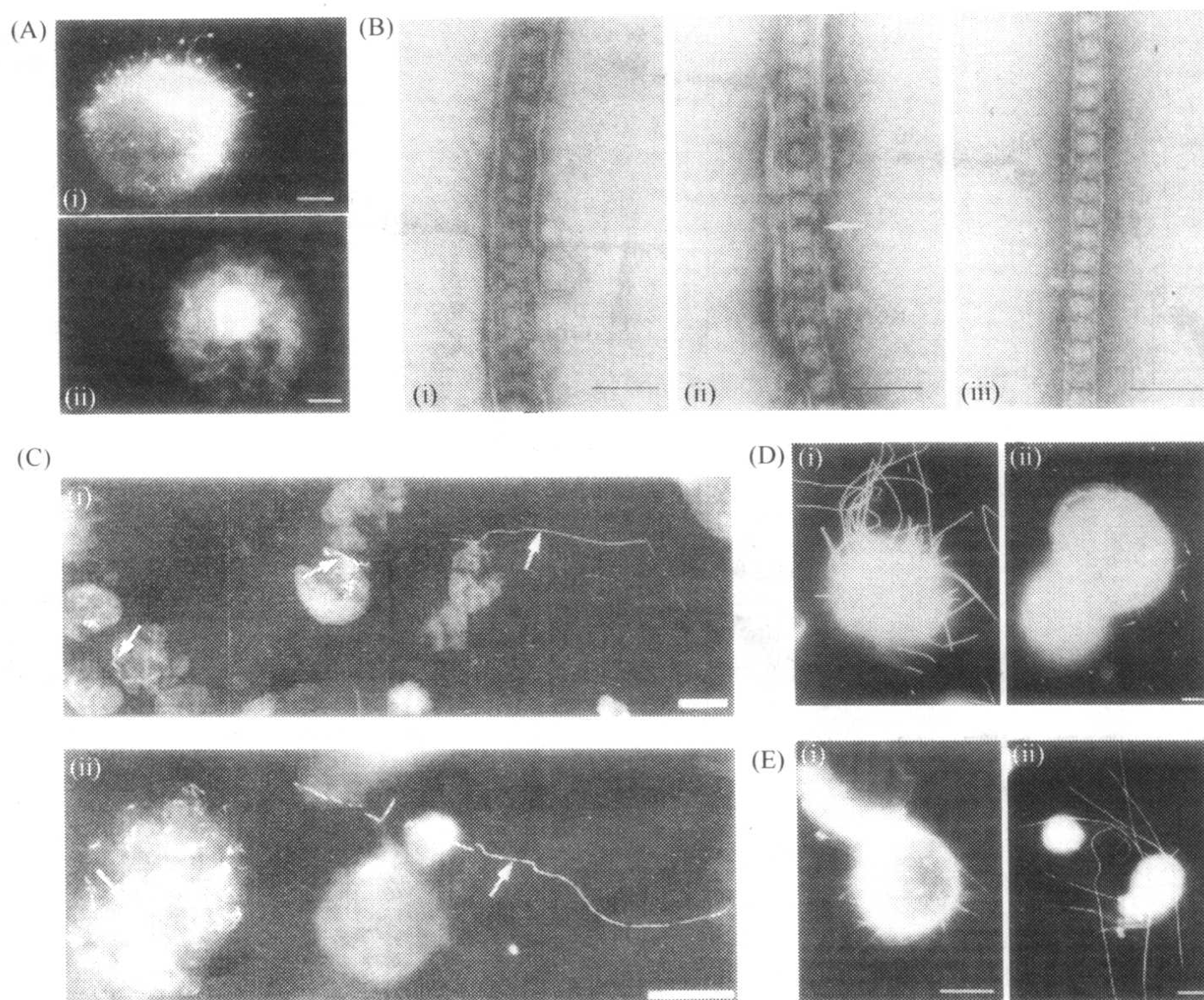


图9.9 自病毒侵染的原生质体伸出的细管(tubule)。(A)用抗48/58 kDa 多肽的血清处理 CPMV 侵染的细胞获得的免疫荧光图像;(i)细管结构自细胞表面伸出;(ii)核中的荧光。(B)在部分纯化组分中,CPMV 细管的电镜图像。细管被质膜包被;(i)经3周冻存后,细管结构仍保持原样;(ii)但质膜部分破裂(箭头处)。用 Nonidet P40处理除去质膜(iii)。标尺=100 nm。(C)CaMV MP 在原生质体中的瞬时表达。(i)免疫荧光分析表达 MP 的拟南芥原生质体表明 MP 特异性细管(白色箭头)自一些原生质体表面伸出,这与自 CaMV 侵染组织分离的原生质体相似(ii)。标尺=20 nm。(D)TSMV 侵染黄花烟(*N. rustica*)原生质体22 h 后用抗 NSm 血清(i)和抗 N 血清(ii)处理获得的免疫荧光图像。箭头指出用抗 N 血清看到的细管线。标尺=5 nm。(E)豇豆原生质体在接种 AMV(i)和 BMV(ii)42 h 后的免疫荧光图像,用同源性的抗 MP 血清标记。标尺=10 nm。(A)、(B)和(E)引自 Kasteel(1999);(C)引自 Kasteel 等(1996);(D)引自 Storm,(1998),均得到允许。

的 MP 均是由 RNA 3 上的 3a 基因编码的,产物大小为 32～36 kDa（基因组组构见图6.13～图6.16）。这些蛋白质在病毒侵染早期积累,协同结合 RNA,与细胞壁组分相结合,定位于胞间连丝区域,增加胞间连丝的 SEL（Zheng *et al.*，1997；Canto and Palukaitis 1999a）。雀麦花叶病毒科（*Bromoviridae*）成员的细胞间移动在大多数情况下均需要病毒外壳蛋白的参与（Rao and Grantham，1996；Kaplan *et al.*，1998），并与细管的形成相关（Zheng *et al.*，1997；Canto and Palukaitis，1999a）[图 9.9（E)]。但是,尽管 CCMV 在大多数细胞类型中的细胞间移动需要外壳蛋白的参与,但在几种寄主的表皮细胞中却不需要（Rao，1997），在豇豆中的移动也不需要（Schneider *et al.*，1997）。尽管 CMV 的细胞间移动需要外壳蛋白,但不必包裹形成病毒粒体（Kaplan *et al.*，1998），而 BMV 需要具有包裹能力的外壳蛋白（Schmitz and Rao，1996）。

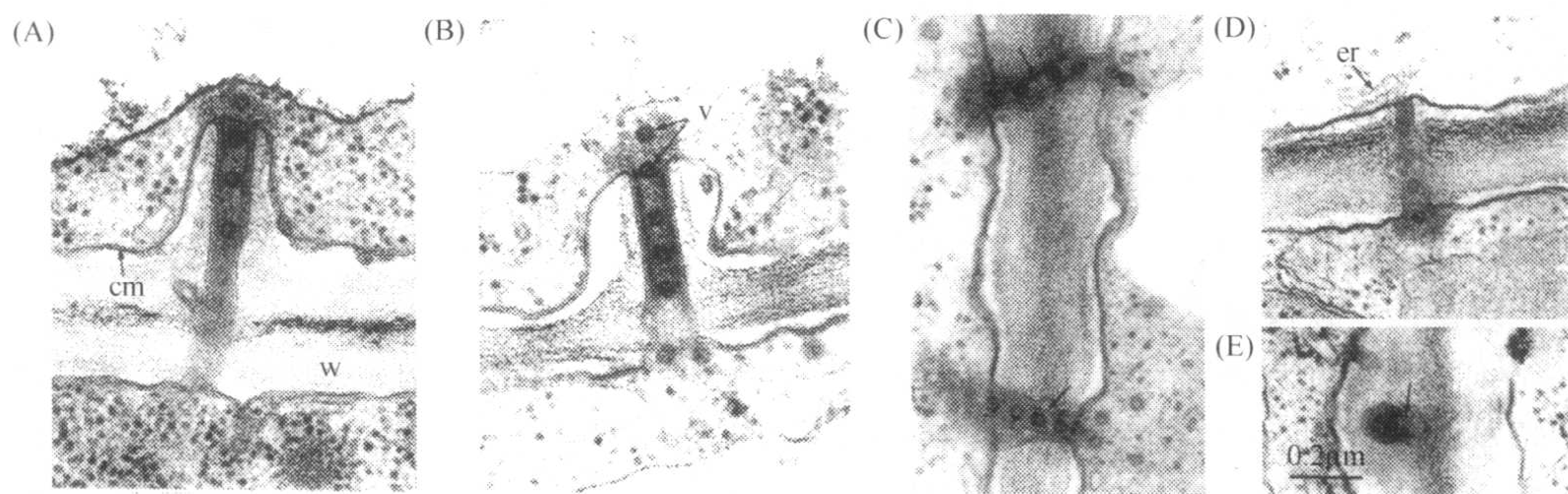


图9.10 花椰菜花叶病毒属成员 DMV 侵染的鱼尾草叶片细胞中几个胞间连丝的纵切面。在(A)和(B)中，细胞壁围绕胞间连丝端部凸出进入细胞质；(C)发现在胞间连丝中(箭头处)质膜下面有一个薄的电子密度层。另外，每个胞间连丝中的物质表现出相同方向的流动；(D)胞间连丝上半部是正常的，底部是经过修饰的。(E)表示一个修饰过的胞间连丝的准横切面。除病毒粒体外，质膜(箭头处)下面的薄密度层在胞间连丝中非常清晰。cm，细胞膜；er，内质网；v，病毒粒体；w，细胞壁。经允许，引自 Kitajima 和 Lauritis (1969)。

BMV 在酵母中的细胞间移动不需要 3a 基因（Ishikawa *et al.*，2000）。

f. 三基因块移动蛋白

数个组群的植物病毒——马铃薯 X 病毒属（*Potexvirus*）、香石竹潜隐病毒属（*Carlavirus*）、葱 X 病毒属（*Allexivirus*）、凹陷病毒属（*Foveavirus*）、花生丛簇病毒属（*Pecluvirus*）、马铃薯帚顶病毒属（*Pomovirus*）、甜菜坏死黄脉病毒属（*Benyvirus*）和大麦病毒属（*Hordeivirus*）等的成员介导细胞间移动的蛋白质是从一套称为三基因块（triple gene block，TGB）的三个重叠 ORF 翻译出来的。这些基因从 5′端分别命名为 TGB 1、TGB 2 和 TGB 3，参与介导病毒的细胞间移动（Lawrence and Jackson，2001）。在大麦病毒属成员中，TGB 1、TGB 2 和 TGB 3 分别称为 βb、βc 和 βd。研究最多的是马铃薯 X 病毒属成员的三基因块（马铃薯 X 病毒基因组组构见图 6.39）。这 3 个 TGB 蛋白的顺式合成（synthesis *in cis*）（直接从病毒基因组上表达）不是必需的（Lough *et al.*，1998）。TGB 1 产物具有腺苷三磷酸酶（ATPase）和 RNA 结合特性（Rouleau *et al.*，1994）以及存在于 RNA 解旋酶中的结构域（Habili and Symons，1989）。这一蛋白质也与胞间连丝的 SEL 的增加有关（Angell *et al.*，1996）。对 WClMV 而言，该蛋白质在功能上还作为细胞间移动的 MP（Lough *et al.*，1998）促进病毒基因组以由单链 RNA、TGB 1 和外壳蛋白组成的核蛋白复合物的运输。TGB 2 的产物含有一未知功能的保守序列，其侧翼为两个潜在的跨膜疏水区；TGB 3 产物的序列是多变的，但总是相当疏水的（Koonin and Dolja，1993）。即使 TGB 1 被归类为 MP，但也需要有 TGB 2 和 TGB 3 的参与（Lough *et al.*，1998）。

现已认识的 TGB 有两类：第一类在大麦病毒属病毒（hordeiviruses）中存在，其 TGB 1 编码 42～63 kDa 产物；第二类 TGB 存在于马铃薯 X 病毒属病毒（potexviruses）和香石竹潜隐病毒属病毒（carlaviruses）中，TGB 1 约为 25 kDa 产物（Solovyev *et al.*，1996）。属于第二类 TGB 的马铃薯 X 病毒属病毒的细胞间移动需要病毒外壳蛋

白的参与（Forster *et al.*，1992；Baulcombe *et al.*，1995），而属于第一类 TGB 的大麦病毒属病毒则不需要（Donald and Jackson，1996）。

BNYVV 的 TGB 缺陷型突变体可以被 TMV P30 反式互补，但不能被在移动中形成连丝微管的 AMV 或 GFLV 的 MP 互补。尽管 BNYVV 的移动能够被 PCV 的 3 个 TGB 蛋白质反式互补，但当 TGB 蛋白质一个一个地被替换时，则不能互补。

g. “双基因”块移动蛋白

香石竹斑驳病毒属病毒（carmoviruses）编码有两个小的部分重叠的 ORF，其编码产物是病毒移动所必需的。CarMV 5′ORF 编码 p7，具有 RNA 结合特性（Marcos *et al.*，1999）。TCV 细胞间移动是由两个小的蛋白质 p8 和 p9 同时以反式作用介导的，但不需要病毒外壳蛋白（Li *et al.*，1998）。TCV p8 中的一个氨基酸的突变影响到病毒在拟南芥中的移动能力（Wobbe *et al.*，1998），这一能力与 p8 的 RNA 结合亲和力呈负相关。两个区域的氨基酸对于 RNA 结合均是必需的（Abgoz *et al.*，2001）。如第Ⅱ节 C 所述，p8 定位于细胞核，p9 在细胞质和核中均存在（Cohen *et al.*，2000）。与 TMV 和其他病毒不同的是，在受侵染细胞的细胞壁中与 GFP 融合的 p8 或 p9 不产生点线图式（punctate pattern），也不与细胞骨架相关联（Cohen *et al.*，2000）。

TCV 的 P8 与拟南芥的一个蛋白质相互作用，该蛋白质有两个可能的跨膜螺旋（transmembrane helix）、几个潜在的磷酸化位点和两个“RGD”序列（Lin and Heaton，2001）。

番茄丛矮病毒属（*Tombusvirus*）成员有两个部分重叠的 ORF，就 TBSV 而言，编码 22 kDa 和 19 kDa 蛋白质；p19 为一种可溶性蛋白质而 p22 是与膜相连的产物（Scholthof *et al.*，1995b）。现有研究表明，至少 p22 是细胞间移动所必需的（Scholthof *et al.*，1995b；Chu *et al.*，1999）；p19 在一些寄主中影响枯斑的直径，表明其在移动中有寄主依赖性辅助作用。

h. 黄症病毒属病毒的移动蛋白（Taliansky and Barker，1999）

越来越多的证据表明黄症病毒属病毒（luteoviruses）ORF 4 编码的 17 kDa 产物是一个移动蛋白。PEMV-1 缺少这个 ORF，需要借助幽影病毒属病毒 PEMV-2 进行细胞间移动（参见第 2 章第Ⅲ节 P. 3）。该 17 kDa 蛋白质具有核酸结合特性，在胞间连丝中积累，能够被磷酸化。

黄症病毒属病毒的外壳蛋白基因有一个弱终止密码子，可以产生具有通读部分（read-through portion）的分子（参见第 7 章第Ⅴ节 B. 9）。缺失这一通读部分后，通过土壤杆菌接种而侵染的植物中病毒的积累受到限制，表明这个蛋白质可能参与病毒的短距离移动（Mutterer *et al.*，1999）。

i. 双生病毒的移动蛋白

二分体的双生病毒（geminiviruses）的细胞间移动是由与 BV1（BR1）相互作用的 BC1（BL1）基因负责的（Carrington *et al.*，1996），可阻止其再进入细胞核（图 9.11）。因此，在此组群病毒中，有两种蛋白质参与新合成的 DNA 从核向邻近细胞的移动：BV1 负责核输出的移动（参见第Ⅱ节 C），BC1 负责穿过胞间连丝的移动。类似的情况也发生在单分体双生病毒中，外壳蛋白具有核穿梭功能，V1 蛋白具有细胞间移动功能并阻止外壳蛋白再次进入细胞核（Boulton *et al.*，1993；Liu *et al.*，1999a）（图 9.11）。

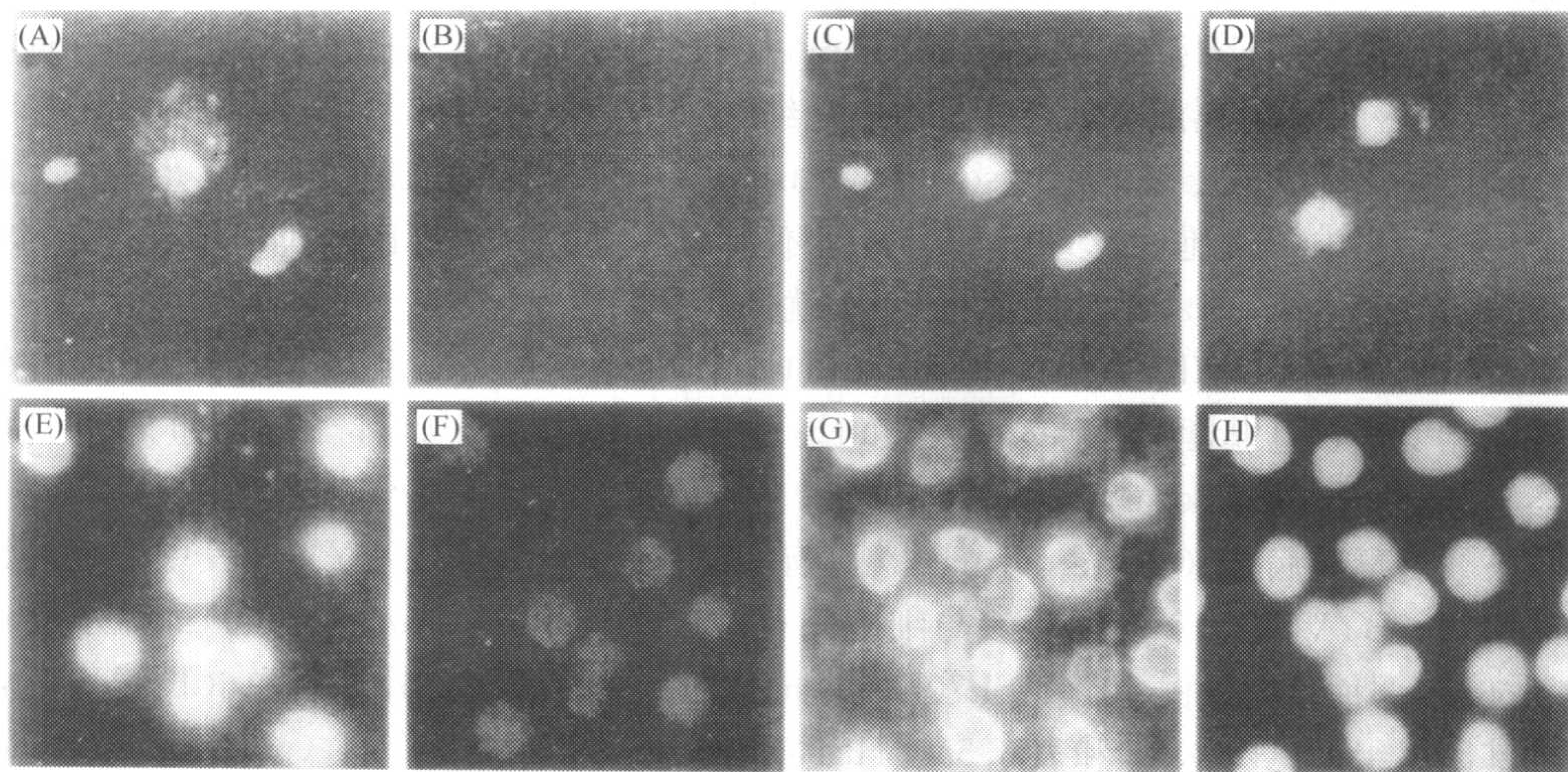


图9.11　免疫荧光染色确定的MSV外壳蛋白在烟草原生质体[(A)～(D)]和昆虫细胞[(E)～(H)]中的亚细胞定位。(A)～(D)分别用(A)和(C)pJITMSVCP(MSV CP片段克隆到源于pUC的瞬时表达载体,pJIT163)、(B)和(D)pJIT163转化BY2烟草细胞,48 h后取样。(A)和(B),在488 nm激发异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)荧光,显出了CP的定位。(C)和(D),是相同的细胞在366 nm激发后的图像,表示核定位的4,6-二脒-2-苯基吲哚二氢氯化物(4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI)荧光。(E)～(H), Sf21昆虫细胞分别被含有野生型CP序列(E)或者[(G)和(H)]缺少氨基端20个氨基酸的突变体CP201(Liu *et al.*, 1997)或者(F)野生型病毒感染。30 h后取样。488 nm处荧光[(E)和(G)]表明野生型或突变CP的存在。对野生型CP,大部分FITC信号在核中,而对突变体CP201,比较488 nm和366 nm处的图像[(G)和(H),描述同一细胞]表明突变体蛋白不在核中积累。核经DAPI染色和366 nm激发得以鉴定,虽然核被强烈染色,但在周围的昆虫细胞质中总是发现有稍弱的染色。承蒙版权所有者(The American Phytopathological Society)惠允,引自Liu等(1999)。

j. 番茄斑萎病毒属病毒的移动蛋白

番茄斑萎病毒（TSWV）的NS_M蛋白已经被鉴定为MP（Storms，1998）（基因组组构见图6.11）。在侵染的植物中，NS_M蛋白早期短暂表达并组装成自原生质体和昆虫细胞质膜延伸的管状结构（Storms *et al.*，1995）[图9.9（D）]。在被侵染的植物中，这些细管延伸穿过胞间连丝并被认为介导推测的未包膜的核衣壳移动到邻近细胞。

在*E. coli*中表达的TSWV NS_M能特异地与TSWV N蛋白相互作用并以非序列特异性方式结合ssRNA。利用酵母双杂交系统（yeast two-hybrid system），从普通烟（*Nicotiana tabacum*）和拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中分离了两种属于DnaJ家族的NS_M结合蛋白（Soellinck *et al.*，2000）。

TSWV也侵染其蓟马（*Frankinella occidentalis*）介体（参见第11章第Ⅵ节）。NS_M蛋白仅在L2发育期的中肠上皮细胞和成虫发育期的唾液腺以及中肠肌肉细胞中检测到（Storms，1998）。NS_M蛋白与电子致密内含体（electron-dense inclusion）相关联，此内含体被认为是再循环蛋白质（recycling protein）降解的自吞噬途径（autophagic pathway）的一部分，据认为不参与病毒在该寄主中的细胞间移动。

k. 其他移动蛋白

马铃薯Y病毒属成员的MP是圆柱形内含体（cylindrical inclusion，CI）蛋白（参

见第 6 章第Ⅷ节 C. 1. b)。丙氨酸分区诱变结果表明 CI 蛋白具有多种功能，主要参与病毒复制、短距离和长距离移动（Carrington *et al.*，1998）。CI 与胞间连丝相关联（见下文）。马铃薯 Y 病毒属成员的外壳蛋白也是细胞间移动所需要的（Dolja *et al.*，1995）。

南方菜豆花叶病毒属病毒（sobemoviruses）5′ORF（编码 18～21 kDa 蛋白质）的突变使病毒丧失了细胞间移动的能力，但不影响病毒的复制（Bonneau *et al.*，1998；Sivakumaran *et al.*，1998）。这证明其 P1 就是 MP。

推定的 TYMV MP，分子质量为 69 kDa，比其他 MP 大得多。与其他 MP 没有任何序列相似性，且非常富含脯氨酸（19.4%）。这一蛋白质参与病毒的系统扩散并且可能参与细胞间移动（Bozarth *et al.*，1992）。

长线病毒属病毒（closteroviruses）具有大而复杂的基因组，BYV 是其中研究最详细的病毒。BYV 有 5 个蛋白质参与细胞间移动（Alzhanova *et al.*，2000）：疏水蛋白 p6、p64，一种热激蛋白 70（HSP70h）的同源物，主要和次要外壳蛋白（长线病毒属病毒基因组组构见图 6.33 和表 6.5）。HSP70h 通过非离子相互作用（non-ionic interaction）与 BYV 粒体紧紧结合，在每个 BYV 病毒粒体中约有 10 个该蛋白质分子（Napuli *et al.*，2000）。HSP70h 失活后完全阻止了 BYV 的细胞间移动（Peremyslov *et al.*，1999）。这一蛋白质有两个结构域，分别是 N 端 ATP 酶（ATPase）域和含有一个肽结合袋（peptide-binding pocket）的 C 端域；HSP70h 也结合微管（Karasev *et al.*，1992）并定位于胞间连丝（Medina *et al.*，1999）。

幽影病毒属（*Umbravirus*）病毒 GRV 的 ORF 4 编码的 28 kDa 蛋白质能够在一些功能上替换 PVX 的三基因块蛋白，表明其可能参与病毒的细胞间移动（Ryabov *et al.*，1998）。

现已发现，LIYV RNA 2 编码的 p26 与胞间连丝相连（Medina *et al.*，2001）。

3. 类病毒的细胞间移动

Ding 等（1998）在研究 PSTVd 时，将荧光染料标记的侵染性转录物注射入叶肉细胞，相对于含有载体序列的 1.4 kb RNA 而言，该核酸移动得更快。当 PSTVd 融合到载体 RNA 时，这一融合 RNA 能够进行细胞间移动。这表明 PSTVd 通过胞间连丝的移动是由序列特异性或结构性模体介导的（参见第 14 章第Ⅰ节 B. 5）。

4. 移动蛋白超家族

现已鉴定了 4 类移动蛋白“超家族”（superfamily）：“30K”超家族；马铃薯 X 病毒属成员（potexviruses）及相关病毒的三基因块产物；一系列小的由类似香石竹斑驳病毒属成员（carmo-like viruses）和一些双生病毒编码的小于 10 kDa 的多肽；三基因块移动蛋白和香石竹斑驳病毒属成员（carmoviruses）的双基因块移动蛋白以及上述芜菁黄花叶病毒属病毒的（tymoviral）MP。

“30K”超家族

基于研究得最清楚的 TMV 30 kDa MP，“30K”超家族是一些已经阐明各种功能的病毒基因产物的集合（Melcher，2000）。这些功能包括：

- 结合核酸的能力；

• 增加胞间连丝的 SEL 在胞间连丝中定位和积累的能力；

• 在微注射中促进 RNA 向邻近细胞移动的能力；

• 在某些情况下形成管状结构并与细胞骨架分子（cytoskeletal element）相互作用的能力。

“30K”超家族移动蛋白成员含有的氨基酸保守模体很少，因此依据预测的二级结构对其分类（Melcher，2000）。这些预测表明存在由 α 螺旋前后毗邻的一系列 β 元素构成的共同的核心结构，核心结构的两侧是可变的 N 端和 C 端区域。简约分析（parsimony analysis）结果将形成细管的 MP 分为一组，而与其他 MP 分开（图 9.12）。

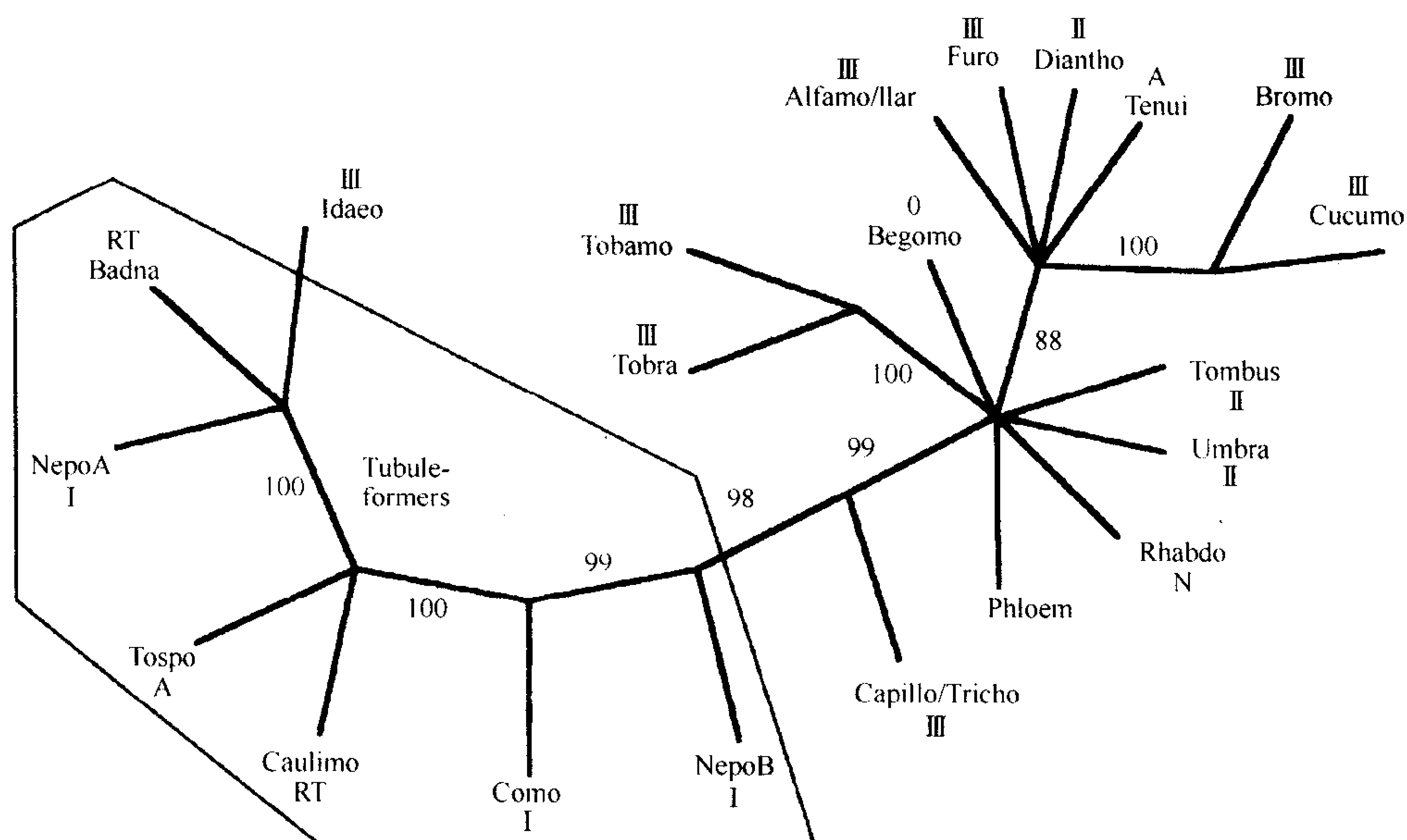


图9.12 采用自引(展)简约法(bootstrapping parsimony)确定的推定(putative) 30 kDa MP 超家族成员的关系。低于80%支持率(100个自引重复)的分支未标出。标记0、RT、N、A、Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ代表病毒编码的聚合酶类型,它们分别为：0,依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶、负链病毒、双义链病毒,以及正链超组群Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ型依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(参见第8章第Ⅳ节 B.1)。细线多角形中的 MP 已知可形成含有病毒粒子的细管。经允许,引自 Melcher (2000)。

5. 移动策略

到目前为止已经鉴定了 5 种移动策略，每一种都在病毒复制和移动之间存在相当强的协调关系。细胞间移动分成两个分离的，但关系密切的时期（phase）：与病毒复制相关的细胞内运输和通过胞间连丝的细胞间运输（Carrington *et al.*，1996）。这将在第 13 章中做深入讨论。

a. TMV 的策略（Mas and Beachy，1999；Reichel *et al.*，1999）

通过在 TMV 侵染性克隆中将 GFP 连到 P30 上，获得了关于 TMV 细胞间移动的许多方面的详细资料。实验中采用了两种方法。因为胞间连丝的开启在扩展的侵染点的前沿受限（Oparka *et al.*，1997），通过侵染点的径向切面将给出移动事件的一个时间

扫描（Padgett *et al.*，1996）。另外一个方法是实时观察固定于琼脂糖中的单个活的原生质体（Mas and Beachy，1998）。图 9.13 给出了这两个阶段，即细胞内和细胞间运输的模型。

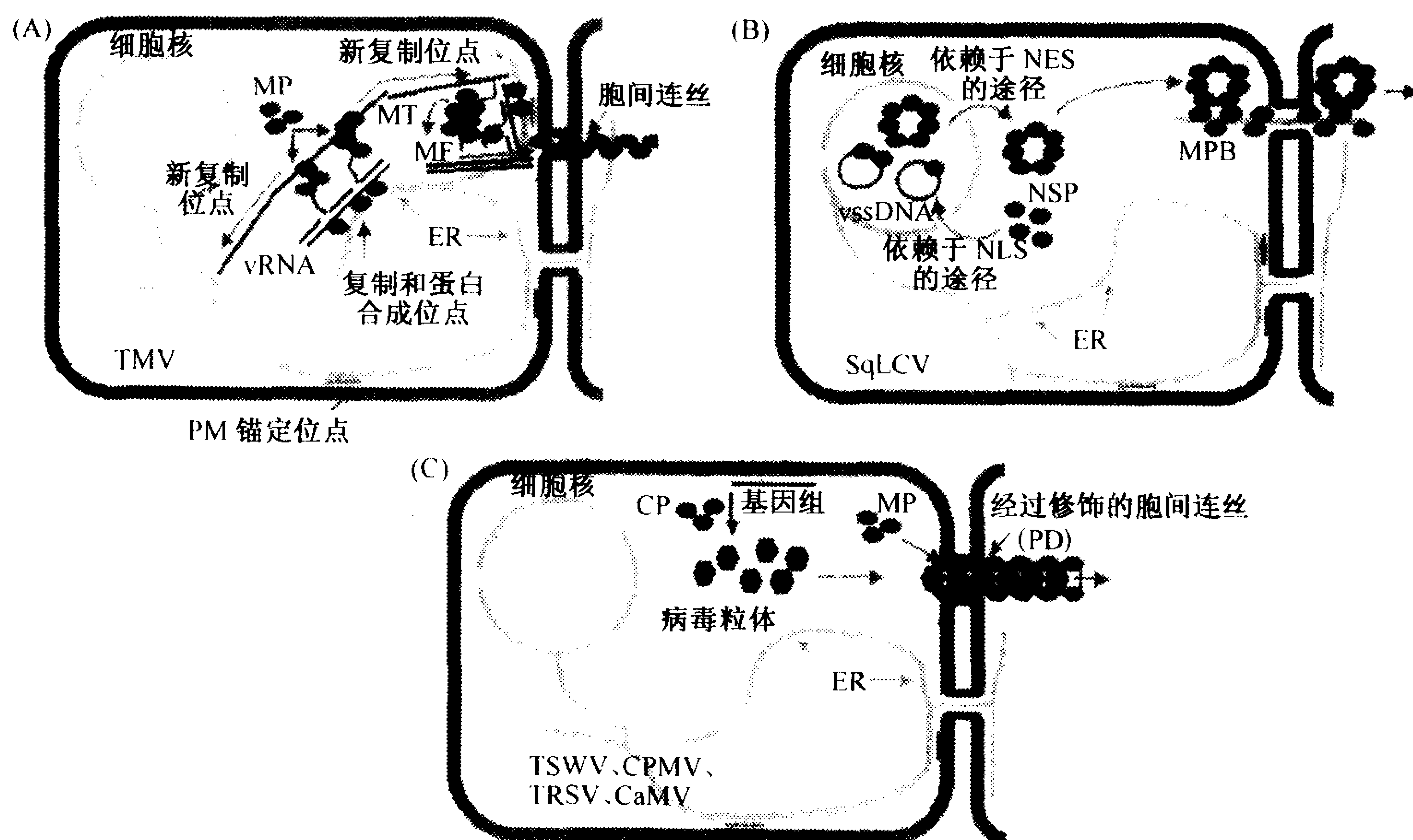


图9.13 （见彩色图版9.4）植物病毒细胞内移动模型。(A) TMV：MP 与病毒基因组 RNA 形成的复合物自附着于内质网的病毒复制和蛋白质合成位点（"病毒工厂"）沿微管移动，以便在其他内质网位点建立更多的病毒工厂。从附着于皮层内质网的病毒工厂，肌动蛋白微丝可能将移动蛋白-基因组复合体运送到推定的细胞壁附着点和胞间连丝处。(B) 双生病毒 SqLCV：NSP 是一个核穿梭蛋白，将新复制合成的病毒 ssDNA 基因组从细胞核转运到细胞质中。MPB 与内质网形成的细管联合，在细胞质中捕捉 NSP-ssDNA 复合体并可能引导复合体沿着细管穿过细胞壁进入邻近细胞。在这些邻近的细胞中，NSP-ssDNA 复合体被释放并将病毒 DNA 靶向细胞核以起始新一轮的复制和侵染。(C) 形成 MP 细管的病毒：TSWV、CPMV、TRSV 以及 CaMV。这些病毒需要外壳蛋白（或等价物）及移动蛋白以进行细胞间移动。包裹于病毒粒体中的病毒基因组移动通过含有移动蛋白的细管，该细管很可能来自高度修饰的胞间连丝。CP，外壳蛋白；ER，内质网；MF，微丝；MP，移动蛋白；MT，微管；NES，核输出信号；NLS，核定位信号；PD，胞间连丝；vRNA，病毒 RNA 基因组；v-ssDNA，病毒单链 DNA 基因组。经允许，引自 Lazarowitz 和 Beachy (1999)。

在病毒侵染的早期，病毒在内质网上复制，导致病毒 RNA 大量积累。P30 与病毒 RNA 共定位（co-localize），这表明病毒的复制和运输发生在相同的亚细胞位点。病毒 RNA 和 P30 共定位于微管（microtubule），而微管据认为可指导 RNA-P30 复合物移动到胞间连丝，P30 开启胞间连丝使得这一复合物通过（胞间运输阶段）。MP 靶向胞间连丝并开启胞间连丝的机制目前还不清楚，但应注意到 P30 特异地结合一种细胞壁酶，即果胶甲酯酶（pectin methylesterase），此酶也是一种 RNA 结合蛋白（Dorokhov *et al.*，1999）。胞间连丝仅在侵染前沿瞬时打开，在前沿的后面胞间连丝就又恢复到正常的 SEL。在病毒侵染原生质体的过程中，检测到 P30 的高分子质量形式，当抑制 26S 蛋白酶体（proteasome）时，其积累得到加强（Reichel and Beachy，2000）。据认为 26S 蛋白酶体降解多泛蛋白化的（polyubiquitinated）P30。还有研究表明磷酸化可能作

为一种机制隔离细胞壁中的P30并抑制其功能（Citovsky *et al.*，1993）；在拟南芥中P30的N端经过了加工，可能会使其失活（Hughes *et al.*，1995）。

上面介绍的TMV和RCNMV之间的相似性，以及（同TMV一样）RCNMV的细胞间移动不需要病毒的外壳蛋白（Xiong *et al.*，1993）的事实表明这两种病毒有相同的局部移动策略。

b. 细管策略（tubule strategy）

至少有3个病毒科*：雀麦花叶病毒科（*Bromoviridae*）、豇豆花叶病毒科（*Comoviridae*）和花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*），以及番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）、杆状DNA病毒属（*Badnavirus*）和纤毛病毒属（*Trichovirus*）等属的成员产生通过胞间连丝或细胞壁的细管。电子显微镜观察表明雀麦花叶病毒属病毒（bromoviruses）、豇豆花叶病毒属病毒（comoviruses）、线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）以及花椰菜花叶病毒病毒（caulimoviruses）产生的细管中含有病毒粒体，而番茄斑萎病毒属病毒（tospoviruses）产生的细管内含有据认为是未包被的核衣壳。这种形式的病毒移动的模型（Carrington *et al.*，1996；图9.13）是MP定位于胞间连丝，MP诱导连丝微管（desmotubule）的去除并组装成单向延伸至相邻植物细胞的细管。在细胞质中装配的病毒粒子通过与MP的相互作用被护送至该管状结构进而被运输到邻近细胞中。

在拟南芥中鉴定了3个抑制CaMV MP突变的寄主因子（Callaway *et al.*，2000）。其中之一是asc1（acceleration of symptoms by CaMV N7，CaMV N7引起的症状加速），定位于染色体1，其余两个分别定位于染色体3和4。

AMV的情况与其他形成细管的病毒有些不同。AMV MP与洋葱鳞茎片表皮细胞的内质网发生联系（Huang and Zhang，1999）。原生质体被侵染后产生自质体膜延伸的细管，但在侵染的本生烟植物的胞间连丝中没有看到细管（van der Wel，2000）。但是，在病毒侵染前沿［此处每个单位面积胞间连丝的数目是未被侵染组织的3～4倍（van der Wel，2000）］发现有与扩大的胞间连丝发生联系的MP（van der Wel，1998），经过修饰的胞间连丝的直径至少是未被修饰的胞间连丝直径的2倍并缺少连丝微管。在这些经过修饰的胞间连丝中可以看到病毒粒体。此外，在侵染前沿之后，胞间连丝的大小又回复到正常大小。基于这些资料建立了如图9.14所示的模型。

c. 三基因块策略（triple-gene block strategy）

尽管马铃薯X病毒属病毒（potexviruses）的TGB 1能够为病毒移动增加胞间连丝的SEL，但病毒细胞间移动需要所有3个TGB蛋白产物以及病毒外壳蛋白（Lough *et al.*，1998）。PVX的TGB 1蛋白（25 kDa）的移动被认为与TGB 2、TGB 3以及外壳蛋白相互作用的调节有关（Yang *et al.*，2000）。这一相互作用最可能发生在外壳蛋白的C端（Fedorkin *et al.*，2001）。目前的假说是TGB 1和外壳蛋白与病毒RNA形成一个复合物以进行细胞内运输。对细胞间运输和胞间连丝定位而言，则还需要TGB 2和TGB 3产物的存在（Lough *et al.*，1998；Erhardt *et al.*，2000）。现在尚不清楚病毒的外壳蛋白在移动时是否形成常规的衣壳（Lough *et al.*，1998；Santa Cruz *et al.*，1998）。

---

* 原文有误，误写成4个病毒科——译者。

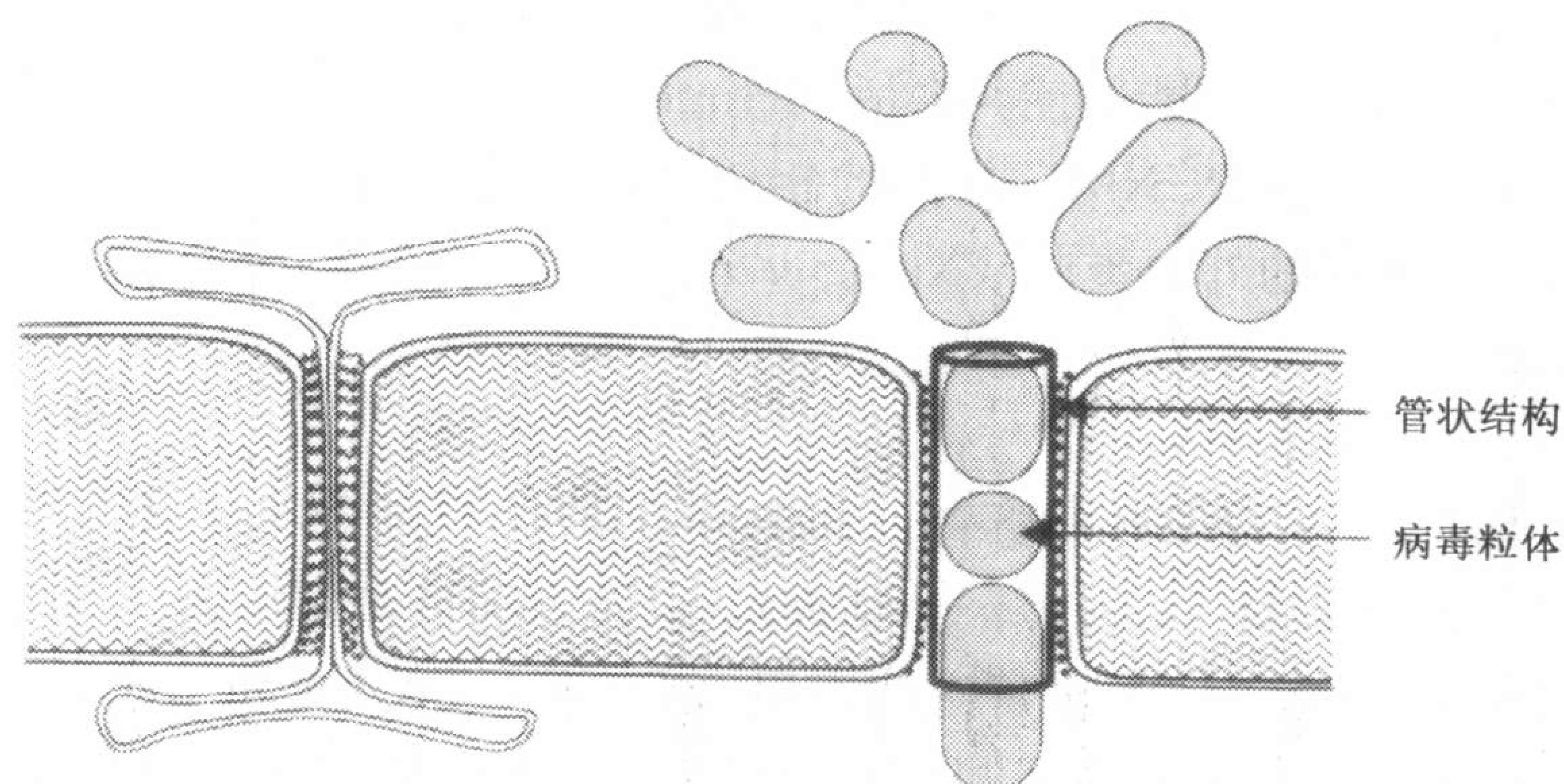


图9.14 AMV 细胞间移动的模型。一个短的 MP 管状结构插入到胞间连丝微孔中。免疫学研究表明这一修饰的胞间连丝仍然含有一般只存在于胞间连丝中的化合物。经允许，引自 van der Wel (2000)。

d. 马铃薯 Y 病毒属病毒策略（potyviral strategy）

通过电子显微镜观察正在推进的 PSbMV 侵染前沿（infection front）处的细胞，Roberts 等（1998）指出 CI 风轮状内含体（参见第 6 章第Ⅷ节 C. 1. b）直接定位于胞间连丝孔口（aperture）上。该事件与接近胞间连丝的胼胝质的瞬时明显减少相关联。病毒外壳蛋白在连续通道中沿风轮轴分布并穿过胞间连丝。在侵染前沿之后，CI 不再附着于细胞壁。这些观察结果表明 CI 将病毒粒体排列起来从而使其通过胞间连丝。但是，尚不清楚 SEL 是否增加以及胼胝质减少的意义。

e. 双生病毒策略（geminiviral strategy）

如上（第Ⅱ节 C）所述，双生病毒在细胞核内复制，其基因组通过病毒编码的蛋白质穿过核膜，细胞间移动是由其他蛋白质介导的。因此，双生病毒移动过程（图 9.13）可能包括：①病毒首先由 BV1 或外壳蛋白转运出细胞核；②这一基因产物与 BC1 或 V2 蛋白相互作用；③病毒穿过胞间连丝进入邻近细胞中。

6. 互补作用

具有亲和性 MP 的病毒的存在能够互补另一病毒在明显的非（许可）寄主中的细胞间移动。当单独接种 SBMV 的豇豆株系（现在称为 SCPMV）时，病毒不能在菜豆（*Phaseolus vulgaris*）叶中积累，但当与 SHMV 同时接种就能积累。在共同接种时，SCPMV 侵入接种叶的非微管叶组织但不向微管组织（vascular tissue）扩展或进行系统侵染（Fuentes and Hamilton，1991）。因为 SCPMV 能够在菜豆原生质体中复制，这表明其可以对菜豆植株产生阈下侵染，在共同接种中，SHMV 的 MP 互补其移动能力的缺陷。但是，这种互补移动仅能到达微管组织。SBMV 在菜豆植物中互补 SCPMV 的系统移动（Hacker and Fowler，2000），表明 SCPMV 系统扩展的受限可能是因为病毒在这一寄主中不能进行装配。SBMV 可侵染菜豆（*P. vulgaris*）但不能在豇豆中积累。当与 SCPMV 共同接种豇豆时，SBMV 能局部扩展但不能系统扩散（Hacker and Fowler，2000）。Othman（1994）观察到了相反的结果，SCPMV 在豇豆中

互补 SBMV 的长距离移动但在菜豆中 SBMV 不能互补 SCPMV 的长距离移动。这些差别的原因还不清楚，但可能是因为二者用的是寄主的不同品种或者病毒的不同株系（分离物）的缘故。

互补能够使局限于韧皮部的病毒侵入维管束鞘外的细胞。例如，与一个侵染叶肉细胞的病毒共同侵染可以使黄症病毒属病毒（luteoviruses）也能侵染叶肉细胞（Barker，1989；Taliansky and Barker，1999）。

最近，研究表明 TMV 和 RCNMV 的 MP 能够互补一种昆虫病毒（兽棚病毒，*Flock house virus*），使其可在本生烟中移动。

E. 从最初侵染的细胞移动的时间

Uppal（1934）在 TMV 侵染绒毛烟（*N. sylvestris*）后的不同时间内揭取叶片的表皮，然后通过接种局部枯斑寄主菜豆（*P. vulgaris*）和心叶烟（*N. glutinosa*）来分析表皮下叶肉细胞的情况。他发现在 24～30℃时病毒在 4 h 内即进入叶肉细胞。用同样的方法已经估计出数种寄主-病毒相互作用中病毒进入表皮下叶肉细胞的时间：28℃时 CMV 侵入豇豆叶肉细胞需要 2 h（Welkie and Pound，1958）；TMV 侵染心叶烟在 20℃时需要 10 h（Dijkstra，1962）；TMV 侵染普通烟草在 27℃时需要 4 h（Fry and Matthews，1963）。

将 TRV 微注射进克里夫兰烟（*N. clevelandii*）的毛状体细胞，Derrick 等（1992）也发现病毒从最初接种的细胞中移动出来需要 4 h。

F. 细胞间移动的速率

有几种方法来估计病毒细胞间移动的速率。3 个烟草花叶病毒属成员（tobamoviruses）在心叶烟上产生的局部坏死斑的半径随着时间以线性方式扩大（Rappaport and Wildman，1957）。被检测的每种病毒的扩散速率是不同的，范围在 6～13 μm/h。Uppal（1934）估测了 TMV 自上表皮细胞移动到下表皮细胞的速率大约是 8 μm/h，这与估计的侧向扩散值一致。细胞间扩散的速率可能随着叶龄、不同的细胞类型以及在叶片的不同方向而表现出差异。TYMV 从系统侵染的幼嫩大白菜叶片小脉的韧皮部扩散出的速率大约是 4 μm/h；就是说通过一个细胞约需 3 h（Hatta and Matthews，1974）。TYMV 在大白菜叶片中细胞间扩散的速率和程度在株系间有很大的差异（Matthews，1981）。利用 TMV 温敏（*ts*）突变体的实验表明病毒细胞间移动的速率还受病毒基因组的影响（Nishiguchi *et al.*，1987）。

在叶肉细胞的垂直壁上单位面积的胞间连丝数目通常比平行于叶片表面的细胞壁上胞间连丝少一些。此外，叶肉细胞趋向于成行紧密连接在一起，终止于侧脉（minor vein）处。病毒在叶肉细胞中沿此路径扩散的速率可能比其他方向更快。TYMV 侵染大白菜形成的局部枯斑中，即使很多天之后也并非所有的细胞都受到侵染。而且，病毒的扩散还受到寄主防卫机制的影响（参见第 10 章第Ⅳ节）。由于这些原因，基于受侵染的细胞数目以及病毒增殖的估计值只能得出细胞间移动速率估计值的平均值。

G. 长距离移动

几种实验为病毒在韧皮部中进行长距离移动提供了证据：

病毒在植物中的扩散受到代谢物（metabolite）流的影响（Bennett，1940a）。若将植物茎干的一段杀死或环切，则大多数病毒的移动受到阻止或明显延迟（Helms and Wardlaw，1976）。一些局限于韧皮部的病毒，如侵染甜菜（*Beta vulgaris*）的 BYV、BWYV（Esau *et al.*，1967；Esau and Hoefert，1972），侵染苦苣菜（*Sonchus*）的 BYSV（Esau and Hoefert，1981），以及不局限于韧皮部、侵染大豆的 TRSV（Halk and McGuire，1973），已经在筛分子（sieve element）中发现病毒粒体的存在。当 TYMV 转运进入大白菜幼嫩叶片时，最先呈现侵染细胞学病征的叶肉细胞总是靠近韧皮部分子（phloem element）而不是木质部（Hatta and Matthews，1974）。

最近，直接证据证实了韧皮部参与长距离移动（Leisner *et al.*，1992a；Roberts *et al.*，1997），并导致了对韧皮部维管束系统的详细分析。近来，Nelson 和 van Bel（1998）、Santa Cruz（1999）、Derrick 和 Nelson（1999）综述了长距离移动。Derrick 和 Nelson（1999）区分了长距离移动和依赖于维管束的病毒积累，前者是病毒在韧皮部内的移动，后者是病毒经过维管束移动后在库组织（sink tissue）中的积累。

在 20 世纪 90 年代早期之前，人们曾认为韧皮部主要参与糖和其他光同化作用产物（photoassimilate）的运输。然而，现在逐渐了解到蛋白质和其他大分子可以在韧皮部中主动转运（Thompson and Schulz，1999）。Fisher 等（1992）提出了蛋白质在韧皮部中转运的"Fisher 模型"：蛋白质在伴胞中合成、加工，加载（load）到源组织（source tissue）侧脉的筛分子中，然后再卸出（unload）进入库组织的伴胞中。

但是，有些病毒利用木质部进行长距离移动（参见第Ⅱ节 G. 3）。

1. 叶脉和韧皮部结构（Derrick and Nelson，1999）

根据叶脉的结构、定位、分支方式和功能，叶脉分为主脉和侧脉。双子叶植物的主脉由薄壁组织包裹形成自叶片表面隆起的主叶脉，通常分支不超过两次。主要功能是长距离运输水、无机营养成分、光同化物以及其他有机物，并可能参与光同化物的卸出。侧脉被叶肉细胞包埋，是一级脉经过 3 次或更多次分支的结果，主要功能是在成熟叶片中装入光同化物。同时，脉还可分为 5 级，Ⅰ～Ⅲ级为主脉，Ⅳ～Ⅴ级为侧脉（Roberts *et al.*，1997；图 9.15）。单子叶植物中主、侧脉区别不明显。脉的结构以及脉相关联的细胞随着叶片由库到源的发育而变化。而这对病毒移动有显著影响。

维管组织被维管束鞘围绕着，由薄壁组织（存在于主脉中）、带伴胞的筛管以及木质部构成（图 9.16）。连接这些细胞的胞间连丝已在本节 D. 1 部分讨论过。

许多种植物在茎中有外韧皮部和内韧皮部。有证据表明光同化物通过离轴韧皮部（连接到外韧皮部）运输出源叶，而不是在近轴韧皮部（连接到内韧皮部）。

2. 病毒进入韧皮部

研究表明，大多数系统侵染的病毒通过侧脉进入维管系统（Roberts *et al.*，1997；Ding *et al.*，1998）（图 9.17）。病毒是经过侧脉的末端、分支点还是全脉各处以侵入叶

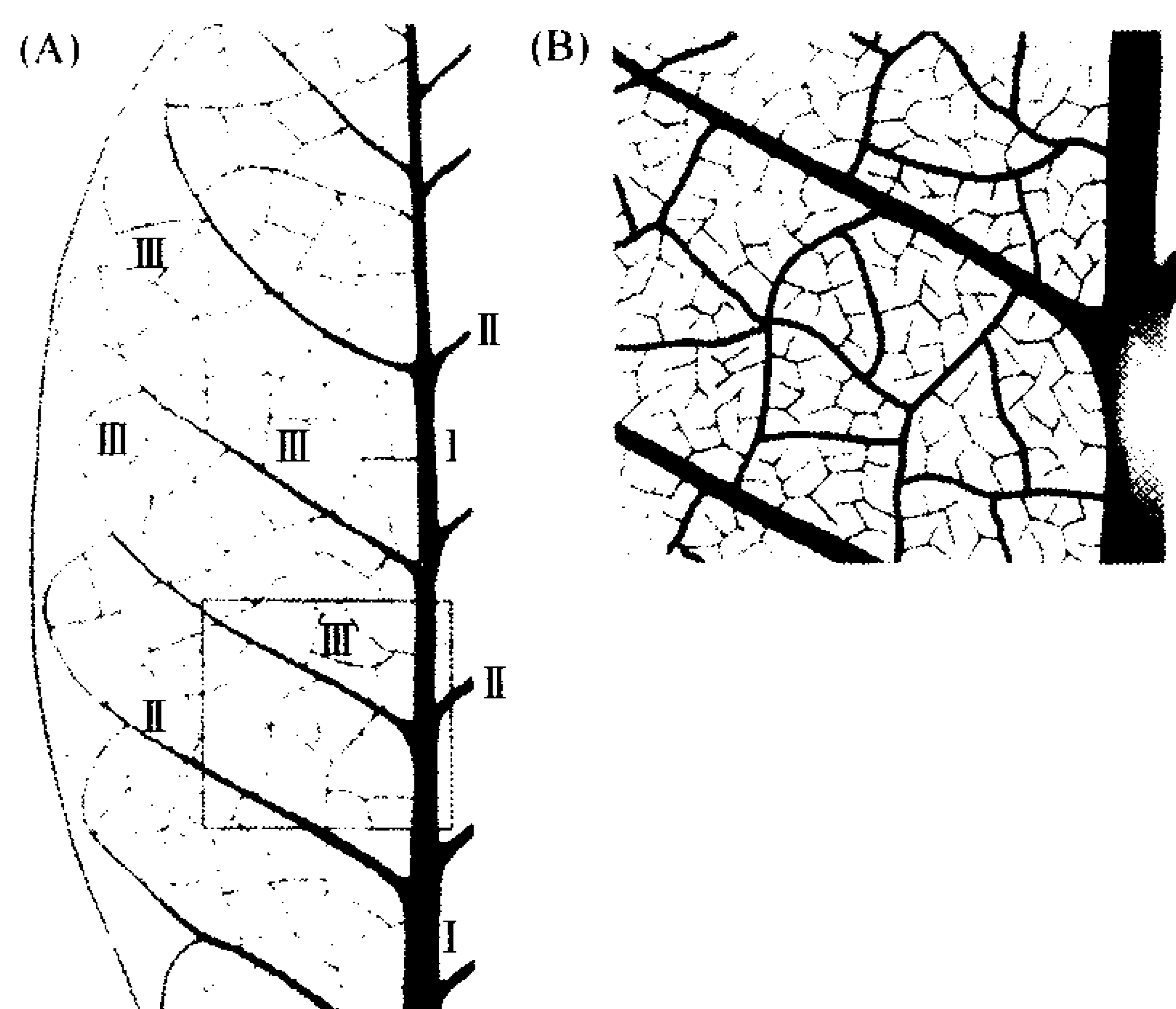


图9.15　本生烟叶片中的各级叶脉。(A)在中脉(Ⅰ)上隔一段产生Ⅱ级叶脉。Ⅲ级脉络位于Ⅱ级脉之间，形成分支脉络系统在叶片上形成分离的组织。(B)显示(A)中方框区域Ⅲ级脉络组织中侧脉(Ⅳ和Ⅴ级)的细节。经允许，引自 Roberts 等(1997)。

脉还有待研究。然而，详细的研究表明 TMV 直接从非维管细胞进入本生烟的侧脉和主脉（Cheng *et al.*，2000）。

不同种的植物维管组织输送光同化物以将其装入筛分子的路径是不同的。在某些植物中光同化物的运输是以质外体（apoplastic）方式进行，另外一些是以共质体（symplastic）方式进行。现在所有的证据都表明病毒移动是共质体运输，即使在以质外体途径装入光同化物的植物种类中也是如此（Santa Cruz，1999）。因此，病毒移动中的主要障碍是病毒自维管束鞘或薄壁组织进入伴胞，自伴胞输出到筛分子。最近研究表明（Santa Cruz，1999；Derrick and Nelson，1999），在转运韧皮部（transport phloem）中筛分子/伴胞复合体中，胞间连丝的 SEL 显著大于其他部位胞间连丝的 SEL，因此在此处病毒装入韧皮部可能不受阻碍。

3. 通过筛分子的病毒运输

利用组织印迹（tissue blot）法，Andrianifahanana 等（1997）发现马铃薯 Y 病毒属成员 PeMoV 首先通过辣椒（*Capsicum annuum*）的外韧皮部向根部移动并在子叶节（cotyledonary node）或其附近进入内韧皮部进而移动到苗（条）端（shoot apex）。同样地，TMV 最先在主脉和接种叶叶柄的外韧皮部以及该叶下部的茎中积累（Cheng *et al.*，2000）。在接种叶之上，病毒主要在茎干的内韧皮部和库叶（sink leaf）的叶柄中。因此，内外韧皮部连接处可能起调控病毒移动的作用。

成熟的筛分子缺少细胞核和细胞质，因此病毒不能在其中复制。通过设计实验研究低温对 TMV 在维管中运输的影响（Susi，1999）以及用表达 TMV MP 的转基因植株的嫁接实验得到了直接证据（Gera *et al.*，1995）。这两个实验系统均表明病毒的维管运输不依赖于在韧皮部中的复制。

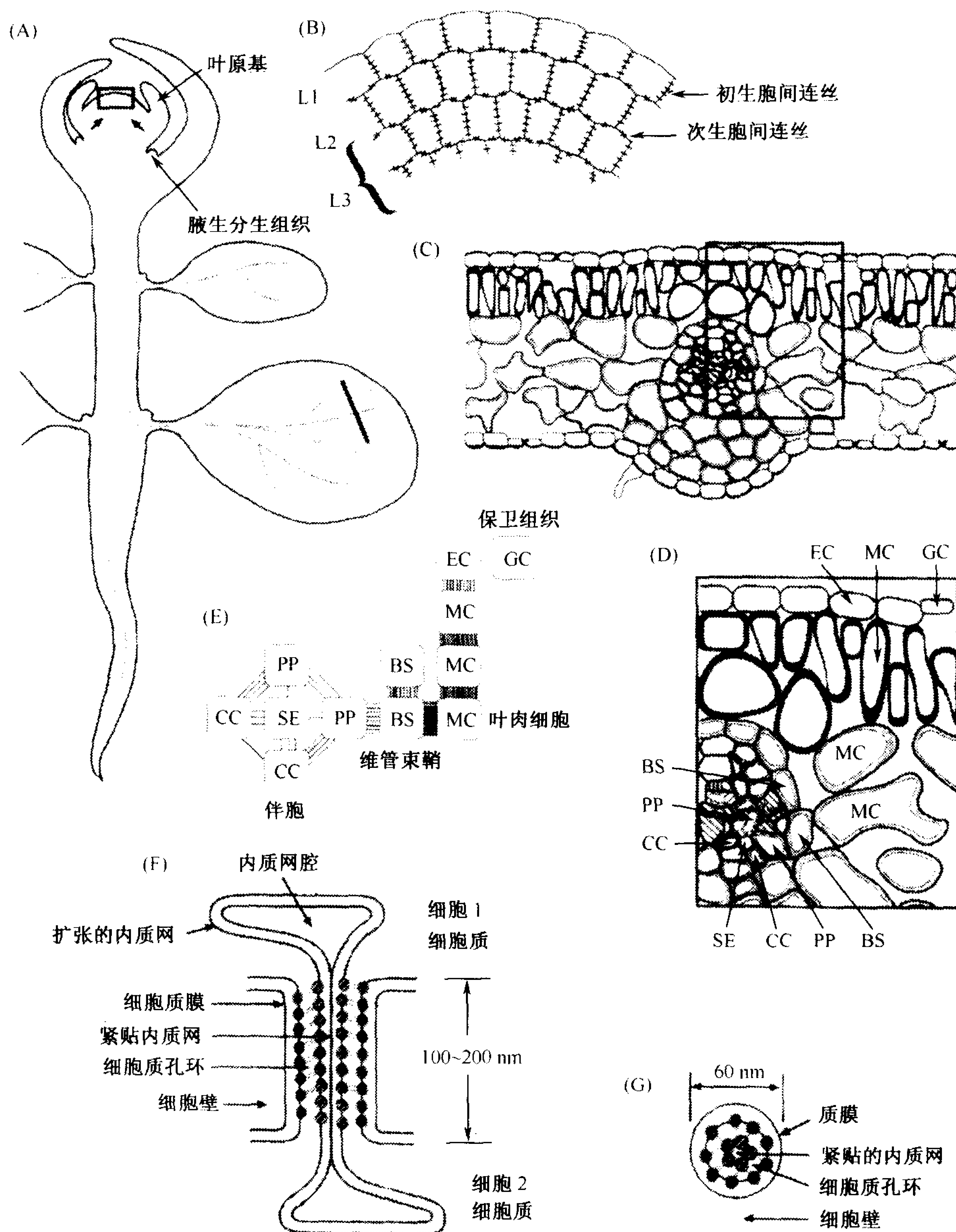


图9.16　高等植物的超细胞特性。(A)植物中轴的一般排列，包括茎端分生组织(方框区域代表分生组织的中心区域)、叶原基(LP)、腋生分生组织(AM)、扩展叶、茎和成熟叶片，以及与茎端分生组织相联系的根。微管组织(韧皮部和木质部)(灰色线条)连接了植物的所有部分。分生组织生长所需的营养经韧皮部输送到分生组织本身后部的区域。这些营养的输送以及通过韧皮部输送的通讯信号分子被认为是从这一区域通过共质体移动出去的。箭头标出了这一路径。(B)茎端分生组织[图(A)方框区域]中央区域由3层构成：L1、L2和L3。图中标明了细胞的排列以及分别在层内和层间连接细胞的初生和次生胞间连丝。(C)叶片成熟区域的横切面[图(A)中黑线处]。(D)为图(C)中方框区域的放大，表明与微管组织和周围叶肉细胞相连的细胞类型：BS，微管束鞘；CC，伴胞；EC，表皮细胞；GC，保卫细胞；MC，叶肉细胞；PP，韧皮部薄壁细胞；SE，筛分子。(E)示图(D)中不同细胞类型间胞间连丝的空间分布。连接特定细胞类型的直线的数目表示胞间连丝的相对密度。(F)初生胞间连丝纵切面。球状的膜内在蛋白质(直径3 nm)分别位于质膜的内部和压缩的内质网外部，一般认为这些蛋白质通过特异性的连接蛋白而相互连接。CA，细胞质孔环(cytoplasmic annulus)；PM，质膜。(G)初生胞间连丝的横切面。注意，CA 分成许多直径为2～3 nm 的微通道。经版权所有者(Kluwer Academic Press)惠允，引自 Mezitt 和 Lucas (1996)。

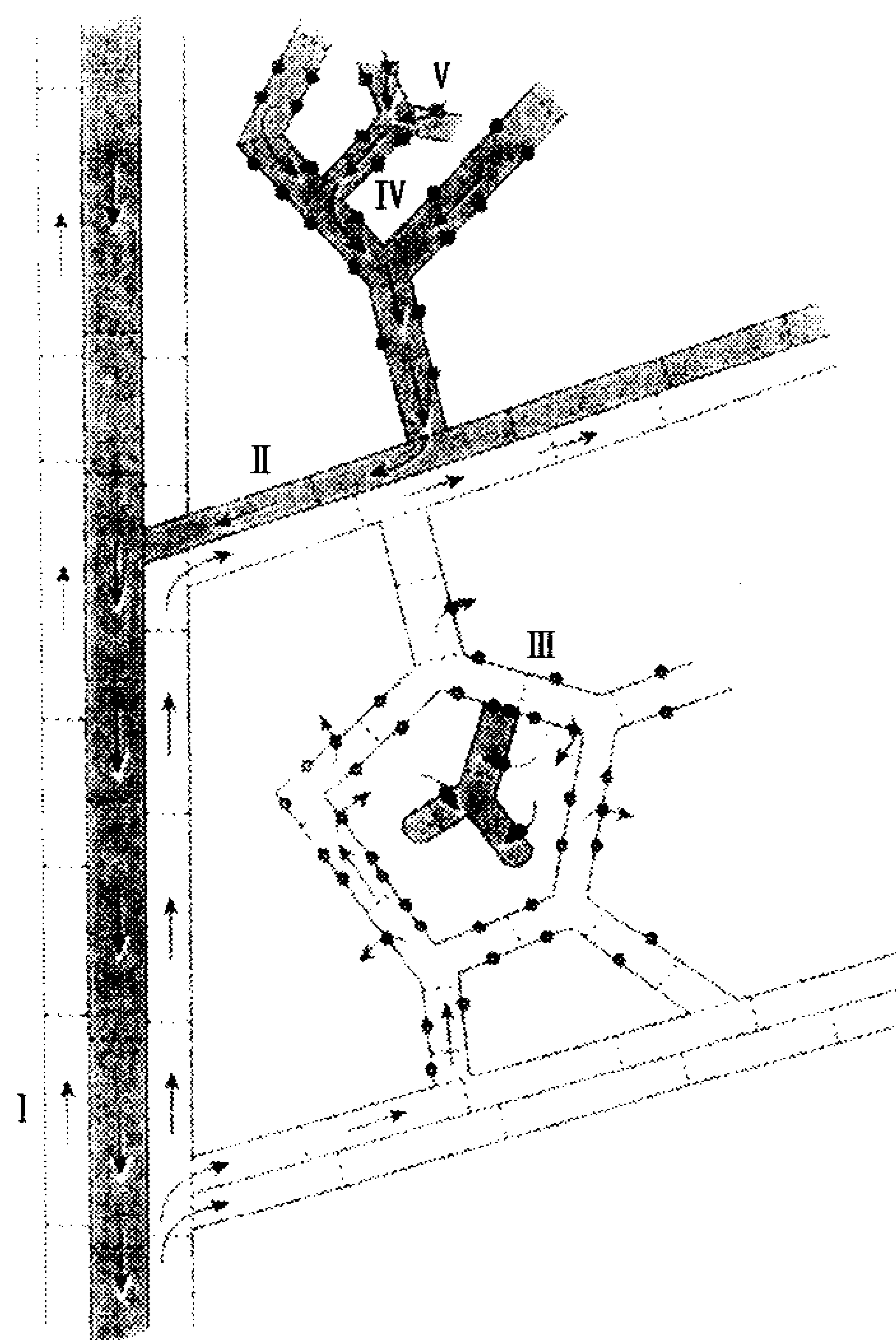


图9.17 （见彩色图版9.5）发育中的本生烟叶片由库到源的转换模型。图的顶部描述了叶片的输出区域（源；蓝色区域），下部描述了叶片的输入区域（库；黄色区域）。溶质和病毒的胞质韧皮部卸载自第Ⅲ级脉络开始（黄色圆圈）。在叶片的库部分，次脉未发育成熟（或者还没有功能；绿色阴影区域），直接通过细胞到细胞的运动从叶肉细胞吸收同化物（以及病毒）。在叶片的源部分，次脉已经成熟。次脉中蔗糖转运因子（绿色方块）的开启发出信号使非原质体蔗糖开始装载。在源区域，第Ⅲ级脉行使输出功能，而不是输入功能，是通过连接脉和处于输入阶段的叶肉细胞之间的胞间连丝（红色圆圈）的下调（down regulation）完成的。双向韧皮部运输（在不同的筛管中）发生在第Ⅰ级脉，但当过渡前沿由上往下通过不同级脉时也可能在第Ⅱ和Ⅲ级脉发生。经允许，引自 Roberts 等（1997）。

4. 病毒自筛分子中输出

病毒自筛分子输出的情况与进入筛分子相似。如本节 D.1 部分所述，库组织中胞间连丝的 SEL 比源组织胞间连丝的 SEL 大得多，因此足以使病毒自筛分子中卸出并在新组织中建立侵染。这一非特异性转运是通过简单的胞间连丝进行的（Oparka *et al.*，1999）。

在比较荧光溶质和发荧光的 PVX 自韧皮部卸出的过程中，Roberts 等（1997）发现二者均主要存在于本生烟的第Ⅲ级脉中（图 9.17）。

5. 病毒运输的形式

大多数病毒需要外壳蛋白进行长距离运输（Santa Cruz，1999；Derrick and Nelson，1999）。但是，一些病毒，如 GRV、BSMV，不需要外壳蛋白就能够进行长距离运输。

这两种病毒均能与一种非结构蛋白［如 GRV ORF 3 的产物（Ryabov *et al.*，1999）以及 BSMV 的 βb 基因产物（Donald and Jackson，1996）］形成核蛋白复合物。还不能确定是否所有需要外壳蛋白进行长距离运输的病毒都以病毒粒体进入筛分子。对一些病毒如 TMV 和 TRV 而言，有足够的证据表明它们以病毒粒体形式运输（Derrick and Nelson，1999）。Blackman 等（1998）的研究表明 CMV 以核糖核蛋白复合体的形式进入筛分子，并在筛分子质膜上组装成病毒粒体。对其他病毒而言，很难将病毒为在细胞间移动而装入韧皮部和从韧皮部卸出后对 CP 的需求与实际的筛分子运输对 CP 的需求区别开来。

其他一些蛋白质对维管依赖性的病毒积累是重要的（Derrick and Nelson，1999；表 9.1）。此外，BNYVV 在一种野生甜菜（*Beta macrocarpa*）的维管中移动可能依赖于 RNA 3 的序列域而不是一种基因产物（Lauber *et al.*，1998a）。但是，必须注意的是，不能将长距离运输直接归因于蛋白质功能，因为有些蛋白质可能参与抑制寄主的防卫机制等。因此，经鉴定认为可促进 CMV 长距离运输的 2b 基因（Ding *et al.*，1995a），是基因沉默的一个抑制子（Brigneti *et al.*，1998）（参见第 10 章第Ⅳ节 H）。

表 9.1　影响病毒在寄主中依赖于微管系统进行积累的病毒因子

病毒因子	病毒	已知或可能的作用位点	参考文献
外壳蛋白	TMV TRV RCNMV	就 TMV 而言，可能在通向SE/CC复合体的入口处或在 SE 内部	Siegel 等（1962） Sänger（1969） Takamatsu 等（1981） Dawson 等（1988） Hamilton 和 Baulcombe（1989） Vaewhongs 和 Lommel（1995） X. S. Ding 等（1996b）
HC-Pro	TEV	可能作用于病毒进入或逃出 SES	Cronin 等（1995）
NIa 的 VPg 域	TEV	可能作用于病毒进入或逃出 SES	Schaad 等（1997）
126/183 kDa 蛋白质	TMV	病毒进入 VPC 和 CC 的入口或病毒进入 SES 的入口、经过筛管的通路或退出 SES	Watanabe 等（1987b） Lewandowski 和 Dawson（1993） X. S. Ding 等（1995b） X. S. Ding 和 Nelson（未发表）
129/186 kDa 蛋白质	SHMV		Deom 等（1994；1997）
1a	CMV		Lakshman 和 Gonsalves（1983） Roossinck 和 Palukaitis（1990） Gal-On 等（1994）
1a	BMV		De Jong 和 Ahlquist（1995）
1	CCMV		Wyatt 和 Kuhn（1980）
αa	BSMV		Weiland 和 Edwards（1994；1996）
2	BMV		Traynor 等（1991）
2	CMV	寄主对病毒细胞间扩散的可能抗性	Edwards 等（1983）

续表

病毒因子	病毒	已知或可能的作用位点	参考文献
2b	CMV		S. W. Ding 等 (1995a)
P19	TBSV		Scholthof 等 (1995a)
基因Ⅵ	CaMV		Wintermantel 等 (1993)
RNA 3	BNYVV		Lauber 等 (1998a)
RNAγ的5′引导序列	BSMV		Petty 等 (1990)
30 kDa 移动蛋白	TMV	(a) 作用于进入或逃出微管系统 (b) 运输蛋白	(a) Hilf 和 Dawson (1993) Fenczik 等 (1995) (b) Arce-Johnson 等 (1997)

承蒙版权所有者 (Springer-Verlag GmbH and Co. KG) 惠允，引自 Derrick 和 Nelson (1999)。

H. 系统移动的速率

侵染性物质自接种叶移动进入植物其他部分的时间在很大程度上取决于寄主种类、病毒、寄主龄期、接种方法和温度等因素。BYDV 在经蚜虫传染后，可能在 12 h 内移动出接种叶 (Jensen, 1973)。TMV 机械接种烟草后 32～48 h 移动出接种叶 (Oxelfelt, 1970)。SYNV 在接种 24 h 内系统性地移动进入叶片和根部 (Ismail *et al.*, 1987)。但是在很多早期研究中通常根据系统症状的产生来估计移动速率。更好的方法是采用叶片分离实验计算病毒移动出接种叶的速率。Gal-On 等 (1994) 采用这一方法研究表明 CMV 在接种后 24～30 h 能够系统扩散。在 Samuel (1934) 的经典实验中，TMV 侵染番茄小叶末端，在不同时间将一批植株切成碎片来跟踪病毒随时间的扩散情况。实验中，他对切取的样品碎片加以保温以使存在的少量病毒增加，然后通过侵染性来检测病毒。图 9.2 表示出中等大小的番茄植株中病毒扩散的进程 (course)。病毒首先进入根，然后进入幼嫩叶片。过一段时间后，中龄或更老的叶片被侵染。在非常幼嫩的植株中，即使经过几个月后较老的叶片也不被侵染。

病毒一旦进入韧皮部，移动可能非常迅速。有记录表明 TMV 在韧皮部中的移动速率大约是 1.5 cm/h (Bennett, 1940a)。Capoor (1949) 报道了 TMV 和 PVX 在烟草茎中的移动速率大约是 8 cm/h。Helms 和 Wardlaw (1976) 报道，相对于 ^{14}C 同化物的吸收速率是 60 cm/h，TMV 在心叶烟 (*N. glutinosa*) 中的移动速率能达到 3.5 cm/h。SBMV 能在 Pinto 菜豆韧皮部中移动，其速率比通过薄壁组织的细胞间移动要快 10～100 倍 (Worley, 1965)。然而，更详细的研究表明，病毒的系统侵染受复合因子，特别是单个叶片和部分叶片的源-库状态的影响 (Roberts *et al.*, 1997)。

病毒长距离移动不依赖于病毒沿转运路线的浓度梯度，但是依赖于侵染物的快速和随机运输。在系统侵染的早期阶段，病毒可能穿过可侵染的组织而不引起侵染 (Capoor, 1949)。

在同一寄主植物中，不相关病毒移动出接种叶片的时间可能不同。例如，Smith (1931) 发现将 PVX 和 PVY 混合接种烟草植株后，PVY 移动到 PVX 前面，在植株的尖部 (tip) 只能分离到 PVY。

叶片系统侵染后可能导致病毒比在机械接种后更均匀地进入叶肉细胞。在 TMV 不

能进行复制的条件下而 TMV 侵染幼嫩烟草叶片的不同温度系统（参见第 8 章第Ⅲ节 A. 1. b）表明，在侵染的幼嫩烟草叶片中，TMV 由维管扩散到细胞间不依赖于完整的病毒复制循环。

I. 病毒在木质部中的移动

少数病毒通过木质部进行长距离移动。环割实验表明，SBMV 和其他南方菜豆花叶病毒属成员能够通过死亡组织进行移动，正是木质部导管在起作用（Schneider and Worley，1959a，b；Gergerich and Scott，1988a，b；Urban *et al.*，1989）。当 SBMV 不能形成正常的病毒粒子时，就不能进行长距离移动（Fuentes and Hamilton，1993），表明这一类型的移动需要病毒粒体。大多数 RYMV 病毒粒体在木质部薄壁组织细胞和筛分子的大的晶体片中积累（Oparka *et al.*，1998）。抗 RYMV 的抗体与细胞壁标记[纤维素 β-(1-4)-D-葡聚糖]一起定位于导管纹孔膜（vessel pit membrane）上，表明导管纹孔可能是病毒在导管间迁移的路径。

对南方菜豆花叶病毒属成员（sobemoviruses）而言，在木质部中的移动与甲虫的传播有关（Gergerich and Scott，1988b）（参见第 11 章第Ⅷ节）。

在叶脉的幼嫩木质部细胞中观察到 LNYV 典型的粒体（Chambers and Francki，1966）。在茎干中的木质部汁液中能获得侵染性病毒。然而，还没有证据表明在木质部中的 LNYV 粒体在系统移动中起何作用。同样地，在木质部中也发现了 RTBV 病毒粒体（Sta Cruz *et al.*，1993）。PMTV 因其粒体的蛋白质螺旋在一端大部分不能卷曲而在移动上有缺陷（Harrison and Jones，1970）。PMTV 在烟草植株中移动很慢，而这一移动模式与木质部中的转运情况一致（Jones，1975）。TMV 缺陷型突变体 PM1 和 PM2 可能也沿同样的路径移动。在某些情况下，在其他组织中正常存在的一些病毒可能在木质部中移动。

J. 病毒在植株中的最终分布

病毒能否进行系统移动取决于局部侵染点及其附近的相互作用事件。我们经常认为病毒确实进行系统移动而在植物中相当均匀地分布，但实际上这是很少发生的。有一些因素能导致病毒的非常不均衡的分布，包括寄主基因、病毒基因、寄主防卫系统和环境因子，这些因素均影响病毒在植物中移动的速率和程度。其中病毒基因和寄主基因的影响将在第 10 章（第Ⅲ节）讨论，寄主防卫系统将在第 10 章（第Ⅳ节）讨论，环境因子将在第 12 章（第Ⅱ节）讨论。

1. 局部枯斑大小的限制

a. 局部坏死斑

在许多寄主-病毒相互作用中，病毒仅进入侵染点附近的少数细胞增殖。这种侵染导致侵染点附近细胞迅速坏死、死亡，病毒的扩散受到限制而不能从死亡的细胞中移动出来。但还有些例子是病毒局部侵染而细胞不死亡（如 PVY 侵染马铃薯）（Gebre Selassie *et al.*，1985）。病毒扩散受限可能是一个与病毒侵染组织周围抗性发展有关的复杂现象。

通过机械接种方法接种只能产生局部坏死斑而不能进行系统扩散的病毒通过嫁接可能会进行系统扩散。如 SBMV，摩擦接种时只能在菜豆品种 Pinto 上产生局部坏死斑，当通过嫁接接种时，病毒能够在茎干中进行上下移动而产生分散的、有限区域的侵染(Schneider and Worley，1959a)。在第 12 章（第Ⅱ节）将讨论环境因子对病毒移动程度和速率的影响。

b. 局部褪绿斑

对许多在侵染寄主时产生局部褪绿斑的病毒来说，褪绿斑的直径并不是不确定地持续增加的。这种限制部分可能是由于接种叶叶龄的增加，但与系统移动问题没有必然联系。

TYMV 移动出接种的大白菜叶片的时间大致在局部斑开始可见之时，通常为 4～5 天。在此后的 8 天中，局部斑的大小并不显著增加。对于 TYMV，可以利用光学显微镜观察原生质体，依据叶绿体是球形还是聚集在一起来估计被侵染细胞的比例（图 9.18）。

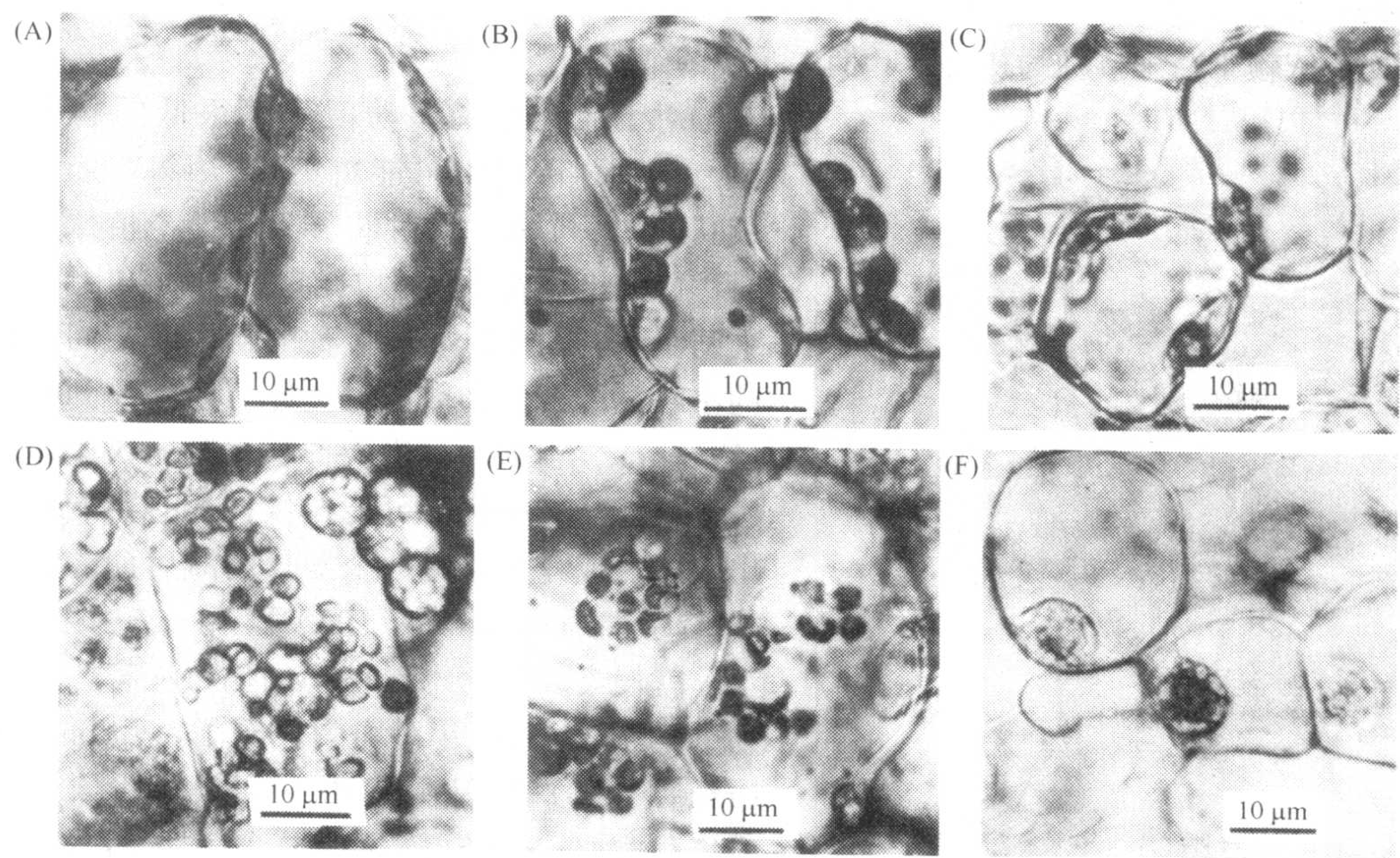


图9.18 TYMV 侵染的大白菜表现花叶的叶片中不同组织类型中的叶绿体畸形情况。(A)健康叶片；(B)浅绿(pale green)；(C)黄绿；(D)具有断裂叶绿体的黄绿组织；(E)高度泡化的叶绿体的黄绿组织；(F)白色组织的每个细胞中具有单一圆形的叶绿体物质块。经允许，引自 Chalcroft 和 Matthews (1967b)。

利用这一方法，已确定即使在非常典型的黄色褪绿斑的中央区域仍有 3 种细胞。第一种是在制备原生质体时已被完全侵染的细胞；第二种是在制备原生质体时看不到被侵染的迹象，但在 6 h 内，叶绿体逐渐球形化并发生聚集。电镜检测发现这种类型的细胞在原初的褪绿斑中已经被侵染，其依据是出现特征性外围小泡（图 8.15），但在叶片中其细胞学影响的进一步发展受到抑制。第三种是在中央区域的一些细胞，用光学或电子显微镜在任何一个阶段观察都没有被侵染的迹象。在不同的实验中，这样的细胞能占到

25%~50%的比例（Matthews，1991）。进一步从褪绿斑的中央取样表明有更高比例的细胞没有被侵染。在局部褪绿斑中没有被侵染的细胞是否等同于系统性花叶症状中绿岛组织中的细胞还有待于进一步确定。

2. 避开侵染

机械接种引起局部侵染从而导致系统侵染的效率在不同的病毒和寄主中差别很大。因此，在一株快速生长的烟草或番茄植株中，一个单独的 TMV 局部侵染斑就足以在植株中引起高比例的系统侵染。相比较而言，Bennett（1960）发现，BYV 侵染苋色藜时，25 个枯斑只能引起 10%甚至更少比例的植株被系统侵染。在每株植物中，要确保 BYV 系统侵染需要 200 个或更多的局部褪绿斑。

一些病毒在移动进入特定叶片时可能有难度。SBMV 和 TRSV 均能在菜豆品种 Black Valentine 的接种叶中增殖，并且均能轻易地从接种叶移动到较幼嫩的叶片。然而，SBMV 只需要 4 天就可以容易地移动到未接种的初生叶（primary leaf）中，而 TRSV 则很少移动到初生叶（Schneider，1964）。Schneider 发现，不知何种原因，TRSV 依赖于在未接种的初生叶叶柄中缓慢的细胞间入侵。

对于能够系统移动但效率很低的病毒来说，非对称性侵染可能更突出。TNV 接种大豆幼苗的一个初生叶片将导致对整个植株的不对称性侵染。在大多数具有三分叶的叶片中，中间小叶的一半以及同接种的初生叶在同一侧的小叶被侵染。这种不对称性可以延伸到根系（Resconich，1963）。当接种叶片时能快速移动进入根系的一些病毒可能在接种根时不能移动出根系，或者在经历一个漫长的滞后期之后才能移动出去（Toberts，1950）。

就侵染多年生木本植物的病毒而言，在植物中的分布可能更不均匀。例如，Gilmer 和 Brase（1963）发现在受 PDV 侵染至少 5 年的成年甜樱桃树和酸樱桃树中，该病毒的分布非常不均一。

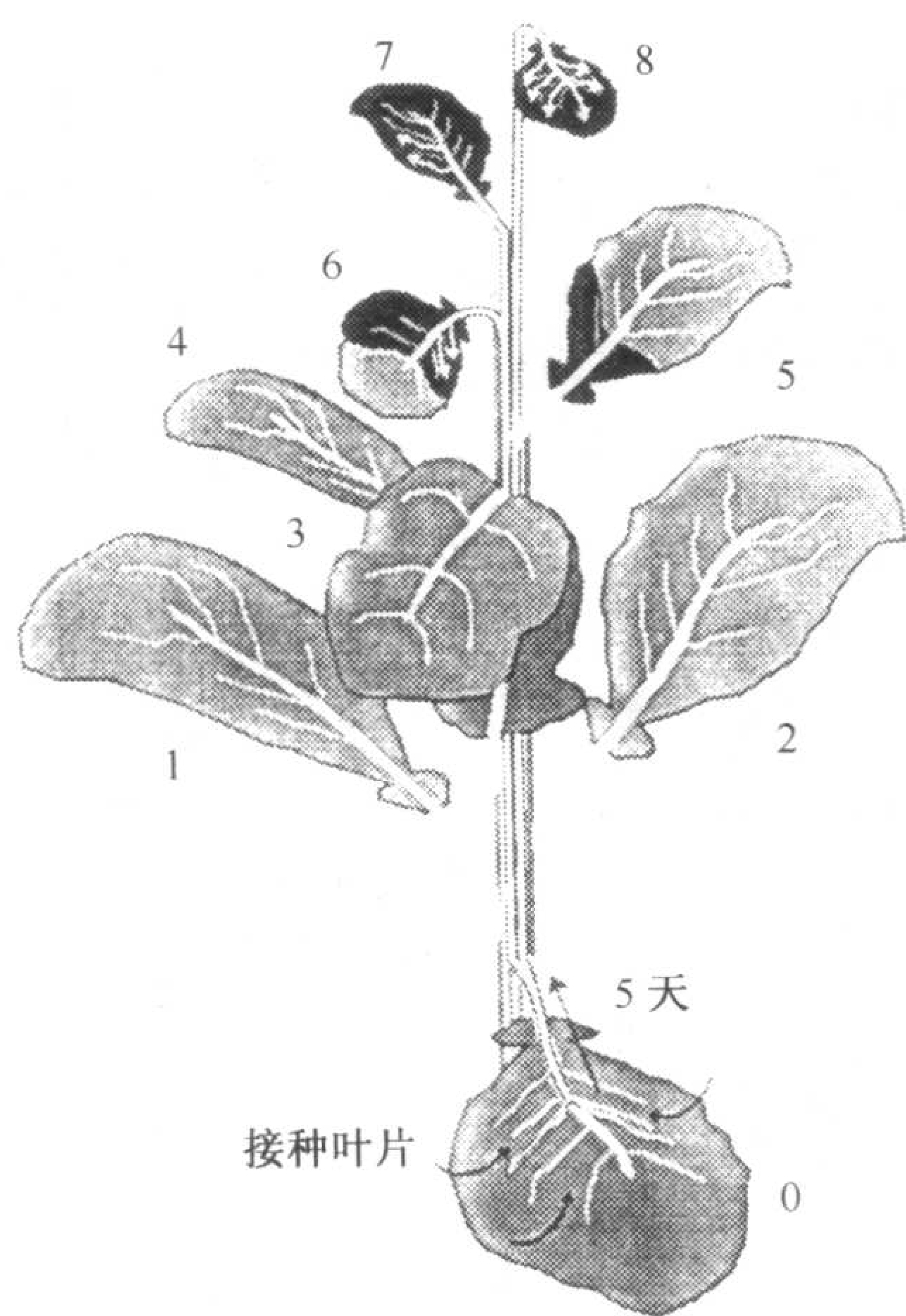


图9.19　系统侵染的芜菁植株的叶片中影响病毒向基(自上而下)和两侧积累的参数。标记数字0的叶片是接种叶。白线表示推断的病毒自接种叶移动到幼嫩的系统侵染的叶片中所通过的微管束。叶片的色调表示光同化物的源-库的转换，浅色表示叶片的成熟部分(源)，暗色表示叶片的未成熟部分(库)。承蒙版权所有者(The American Phytopathological Society)惠允，引自 Leisner 等(1992b)。

3. 系统性分布

大多数通常产生系统侵染的病毒并不会侵染所有叶片并产生症状。Leisner 等（1992b）描述了一个普遍现象，CaMV 在芜菁植株中的系统分布（图 9.19）受到植株的叶序（phyllotaxis）和叶片发育阶段的影响。这反映出病毒在源-库之间的长距离移动与接种叶（源）连接的韧皮部相关。随着叶片在光同化物输入的

源-库关系转换中，光同化物和进入叶片的病毒的数量呈逐渐地向基（自上而下）降低（basipetal decline）的趋势，因此在较为成熟的库叶中只有叶片基部受到侵染。

很多系统侵染的病毒通常不能侵染新生幼嫩叶片，甚至发生恢复（recovery）和再侵染（reinfection）的循环。现在认为这是由于植物启动了正常的防卫系统（参见第10章第Ⅳ节）。

4. 病毒浓度随叶龄的升降

一些病毒在侵染的叶片中数量迅速上升然后衰退。把植株看作一个整体时，在其生长过程中的任何时间，不同叶片中病毒的分布非常不均匀。图9.20表示出在21周的时期内田间生长的烟草叶片中PVA的分布。病毒浓度的变化可能是由于正常的植物防卫系统（参见第10章第Ⅳ节）和正常的植物蛋白质周转系统之间组合的结果。

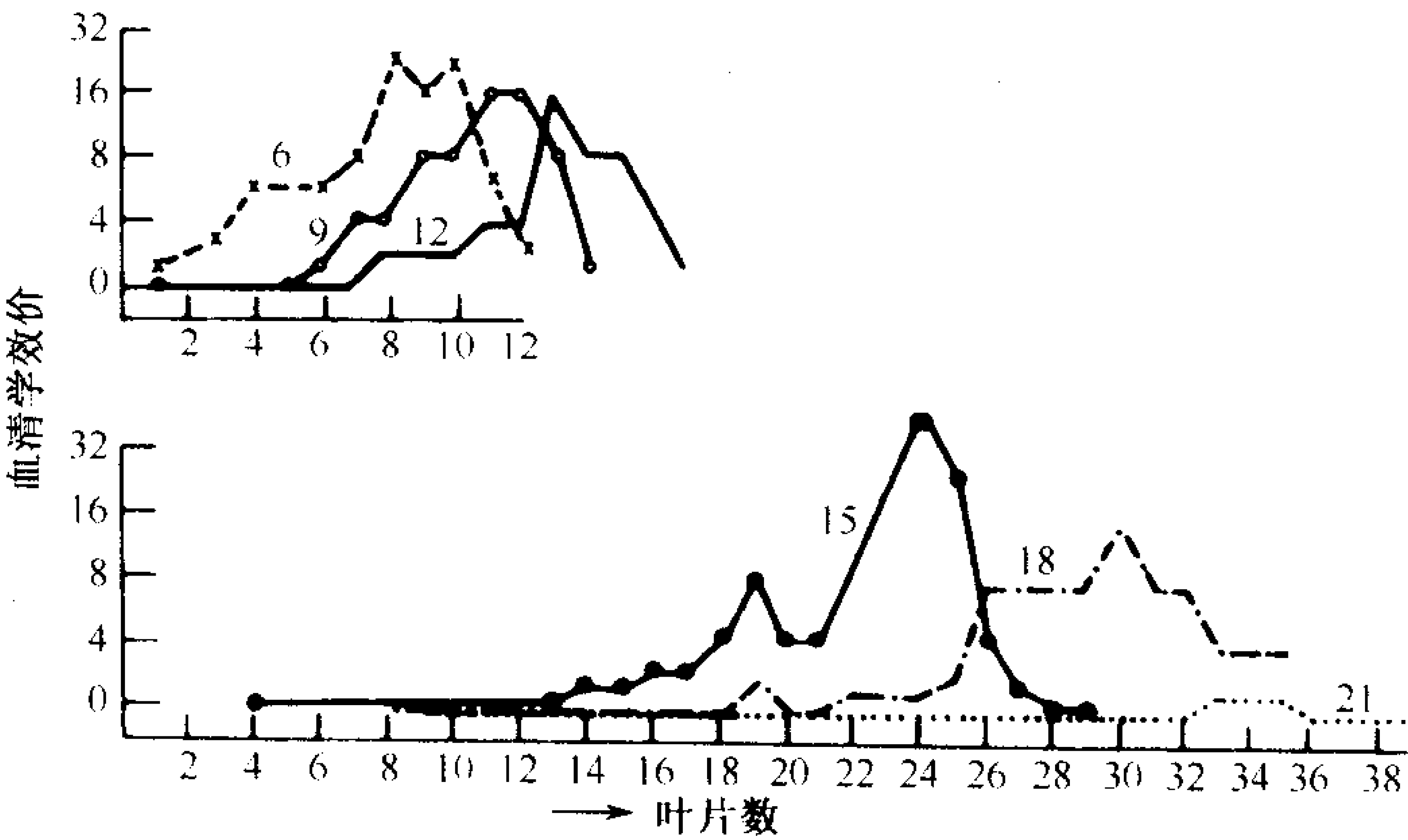


图9.20 田生烟植株在第一片叶接种后，PVA浓度随叶龄增加而发生的变化。病毒浓度用血清学方法测定。自第15周起，一些老叶片开始死亡。曲线旁边的数字表示侵染后的周数。承蒙版权所有者（Blackwell Science Ltd.）惠允，引自Bartels（1954）。

5. 不同器官和组织中病毒浓度不均

被病毒系统侵染的植株中，不同器官中的病毒浓度可能不一致。对已研究过的大多数导致花叶症状类型的病毒而言，病毒在叶片中的浓度比在植株其他部分的浓度要高得多。例如，TYMV在茎和根系以及展开的叶片的中脉和叶柄中的浓度只有叶片中的1/20～1/10。

6. 限制于某些组织的病毒

CTV不能经机械摩擦传播，但可以被刺吸韧皮部的蚜虫传播。Price（1996）发现在病毒侵染的酸橙植株的韧皮部细胞中有类似病毒的杆状物，在薄壁组织中没有发现类似的杆状物，很可能该病毒局限于韧皮部。黄症病毒属病毒和其他一些局限于韧皮部的病毒通常仅在韧皮部薄壁组织、伴胞和筛分子中存在（Taliansky and Barker，1999）。

BYV 在侵染早期被限制于韧皮部，但在侵染的后期，就遍布于叶肉细胞和表皮细胞中（Esau *et al.*，1967）。用特异性荧光抗体染色后发现，WTV 的病毒抗原蛋白被限制在甜苜蓿的根和茎肿瘤的韧皮部组织以及木质部区域一些厚壁细胞中（Nagaraj and Black，1961）。类似地，曲顶病毒抗原也仅在一些寄主的韧皮部中可检测到（Mumford and Thomley，1977）。

7. 在显花叶症状的叶片中病毒的不均匀分布

显花叶症状的病叶的暗绿区域与黄色或黄绿区域相比，通常含有很少量的病毒。结构不同的病毒以及侵染单子叶或双子叶植物寄主的病毒均存在这一现象。因此这种现象可能是花叶病的一个相当普遍的特征。图 9.21 显示了 TMV 在显花叶症状的叶片暗绿区域和黄绿区域连接处的分布。暗绿区域中病毒浓度低的可能原因将在第 10 章中第Ⅲ节 O.4 讨论。花叶病病毒的不均匀分布也存在于花瓣和碎色花中。因此，TMV 在粉红色烟草花上产生白色区，看来病毒被限制在这一区域。

图9.21 TMV 在显花叶症状的烟草叶片中的暗绿色区域（右侧）和黄绿区域（左侧）连接处的分布，这是通过电子显微镜检查宏观可见的连接处的超薄切片而确定的。粗黑线的左侧，所有细胞至少含有 TMV 的一个晶状内含体。右侧则看不到内含体，细胞表现正常。数字表示在每个细胞切片中看到的类似病毒的杆状物数目。x，TMV 晶状内含体；•，观察到的两个细胞间的胞间连丝。经允许，引自 Atkinson 和 Matthews（1970）。

8. 病毒在近苗（茎）端分生组织的分布

有证据表明一些病毒可以侵入原初分生组织。例如，Walkey 和 Webb（1968）利用电子显微镜检验了切下的西葫芦顶端分生组织，发现在各种寄主的顶点均有一些病毒存在。已经在烟草条（shoot）的顶端原始细胞（apical initial）中观察到病毒粒体（Ro-

berts *et al.*，1970)。PepRSV 在根端（root apex）和苗端（shoot apex）的分生组织细胞中被检测到（Kitajima and Costa，1969)。在靠近马铃薯苗端和苗端内的组织中已经检测到 PVX 杆状粒子（Appiano and Pennazio，1972)。在兰属（*Cymbidium*）植物顶端分生组织的具分裂活性的细胞中观察到 ORSV 杆状粒子（Toussaint *et al.*，1984)。在 BSMV 侵染的小麦根部和苗端组织中，BSMV 侵染的成簇细胞分布的很不均匀（Lin and Langenberg，1984b)。

然而，在许多病毒和苗端的作用中，在靠近苗端或根尖的一个变化的长度内不含有病毒或仅含有极少量的病毒（Mori *et al.*，1982；Faccioli *et al.*，1988)，这个长度通常约为 100 μm 但也可到 1000 μm。这种情形已经被用来通过组织培养切下的苗端来获得无毒克隆（参见第 16 章第Ⅱ节 C. 2. c 和 C. 2. d)。但是，用一些病毒侵染的植物，我们可以从含有病毒的分生组织开始，经过一段时间的组织培养就可以获得无毒的小植株（Walkey *et al.*，1969)。

已发现在被几种病毒之一侵染的植物的根端检测不到病毒（Appiano and D'Agostino，1983)。Smith 和 Schlegel（1964）研究了 ClYVMV（在 Matthews，1991 中描述为一种 tymovirus）在蚕豆（*Vicia faba*）根端中的分布。他们切取了一系列截面用来测试其侵染性（图 9.22)。在测试方法的限制内，根端的前 400 μm（包括根冠和分生组织）是不含病毒的。

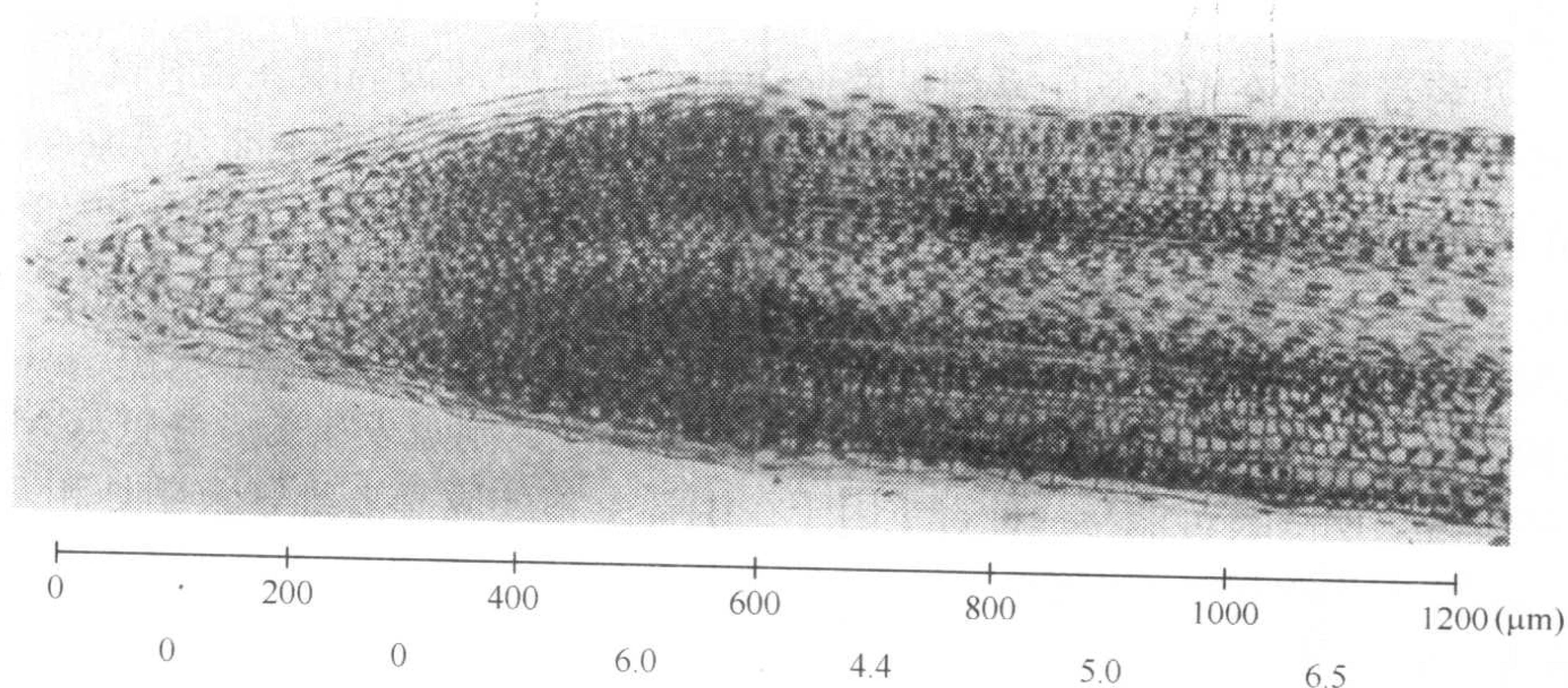


图9.22　ClYVMV 在蚕豆根尖中的分布。纵切面表示用一系列200 μm 厚的切片的提取物接种后获得的局部枯斑数目。承蒙版权所有者(The American Phytopatho logical Society)惠允，引自 Smith 和 Schlegel (1964)。

一些病毒，如双生病毒科（*Geminiviridae*）成员以及可能有一些花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）成员其自身复制需要正在分裂的细胞，在分生组织中却未发现（Lucy *et al.*，1996)。事实上，在分裂着的细胞中 CaMV 的复制看来受到了抑制（Covey and Turner，1993)。双生病毒科成员编码可调节成熟细胞以支持 DNA 复制的蛋白质（参见第 8 章第Ⅷ节 D. 5)。

分生组织区域的细胞不能支持病毒复制的原因正逐渐清楚。看来是因为在分生组织细胞中植物基因沉默的防卫系统得到增强，从而抑制了病毒的存在和复制。

K. 寄主因素

如上所述，寄主蛋白参与病毒的移动，并且前面已提到病毒移动蛋白和寄主蛋白的一些相互作用。直接证据来自病毒移动蛋白与细胞骨架的相互作用，很可能是与其蛋白质相互作用（参见第Ⅱ节 D. 2. a）。移动蛋白可能还与胞间连丝蛋白相互作用，就双生病毒科和花椰菜花叶病毒科成员而言，还可能与核孔蛋白质相互作用。

有各种其他间接证据表明有寄主蛋白的参与。Hull（1989）得到了一些证据，例如，某些病毒在一些植物上仅引起阈下侵染，但可系统侵染其他种类的植物。此外，由显性基因 *Tm2* 介导的番茄对 TMV 的抗性可阻止病毒的细胞间扩散。而这种抗性通过简单改变 TMV 的移动蛋白就被克服（参见第 10 章第Ⅲ节 E. 3）。还不清楚这一抗性是否控制 MP 与一种寄主蛋白质的相互作用，因为其他可能的蛋白质尚未鉴定。

但是，胞间连丝和核孔蛋白并非参与决定病毒在植物中扩散的仅有的寄主蛋白。病毒移动能够被寄主防卫系统中的蛋白质限制，这些蛋白质可能参与局部枯斑形成、系统获得抗性或者基因沉默。

CPMV、CaMV 和 TSWV MP 在原生质体和昆虫细胞中形成细管（参见第Ⅱ节 D. 4. b），表明不需要特定的植物蛋白质就可以产生这些结构。但近来研究发现 AMV MP 与一寄主蛋白质相互作用（van der Wel，2000），表明这一观点还需进一步考虑。

a. 本生烟

有一些病毒能够在本生烟中系统扩散而在其他寄主中却被局限在接种叶中。例如，早期曾注意到，P30 基因发生突变的 TMV 能够在本生烟中扩散而不能在普通烟中扩散（参见第Ⅱ节 D. 2. a）。ORSV 能在本生烟中系统扩展但在普通烟中受到局限（Hilf and Dawson，1993）。同样地，RCNMV 的 4 个 MP 突变体，能系统侵染本生烟但在另一种烟草（*N. edwardsonii*）和豇豆（*Vigna unguiculata*）中受限（Wang *et al.*，1998b）。在这些情况中，长距离移动的受限看来是在维管束鞘或其附近发生的，并且与 MP 相关联。这些发现表明 MP 可能与一种寄主因子在维管束鞘处或靠近维管束鞘处相互作用，并且这一因子在物种间是不同的。

b. 移动的速率

RCNMV 突变体间的不同不仅在于是否能够系统侵染本生烟，而且它们在豇豆中系统移动的速率也是不同的。对移动慢的突变体而言，被削弱的长距离移动使得寄主植物更容易发动防卫反应从而降低病毒建立系统侵染的可能性（Wang *et al.*，1998b）。

c. 长距离移动

TEV 在侵染非感病的普通烟草品系 V20 时被限制在伴胞/筛管交界处，阻止了病毒进入筛分子或从筛分子中移动出来（Schaad and Carrington，1996）。对 V20 与感病品系 Havana 425 的杂交分析表明，两个不连锁的基因座（unlinked loci）上的隐性基因的互作可能导致了对病毒移动的限制。

一个拟南芥突变体（*vsm1*）不能支持烟草花叶病毒属成员 TVCV 和 TMV 番茄株系的系统移动，局部移动可能在病毒进入维管系统时受到了阻止（Lartey *et al.*，1998）；但是，香石竹斑驳病毒属成员 TCV 可在这一突变体寄主中系统移动。

4 个拟南芥生态型（如 C24）能够支持 TEV 的系统侵染，而 TEV 在其他一些生态

型（如Col-0和Col-3）里却被限制在接种叶中（Mahajan *et al.*，1998）。通过C24与Col-3的杂交和回交分析，在第一号染色体上鉴定了限制TEV侵染表型的显性基因座*RTM1*。突变分析发现，Col-1限制侵染的表型是一个多基因性状，需要至少3个基因座*RTM1*、*RTM2*与*RTM3*（Whitham *et al.*，1999）。已经用作图克隆法（map-based cloning）分离出了*RTM1*基因，其产物类似于来自波罗蜜（*Artocarpous integrifolia*）的一种凝集素——波罗蜜凝集素（jacalin）的α链，以及含有类似于波罗蜜凝集素的多重重复（multiple repeat）序列的多种蛋白质（Chisholm *et al.*，2000）。

在马铃薯（*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*）的二倍体杂交种中，存在着一个隐性基因*ra*，该基因完全阻止了PVA的维管运输（Hamalainen *et al.*，2000）。

L. 讨论

随着近来我们对病毒在植物中如何移动的理解的加深，不仅发现了病毒自身的一些信息，而且还了解到一些植物如何起作用的信息。其中包含的机制是错综复杂的，但是在第11、12章中描述的机制之一即可导致植物受到侵染后成为病毒侵染其他植株的侵染源。

对植物病毒移动的研究中已经有了一些植物功能的新发现，但离详细了解还相差甚远。侵入到表皮或叶肉细胞的病毒利用各种各样的机制进行细胞间移动，因此能够被运输到植物中更远的部分。它们有现成的基因，其产物能够打开胞间连丝使侵染单位进入到未感染的细胞。在几年前还认为，除了病毒外，大分子不能进行细胞间移动。然而，已发现越来越多的蛋白质能够从一个细胞移动到另外一个细胞，尽管是选择性的。这些蛋白质包括：同源（异型）框（homeobox）基因产物KNOTTED1（KN1）及其mRNA［在发育着的分生组织中能够选择性地进行细胞间移动（Lucas *et al.*，1995）］和病程相关蛋白PRm（Murillo *et al.*，1997）。此外，植物中的一个TMV P30的种内同源基因（paralogue）产物可促进mRNA转运进入韧皮部（Xoconostle-Cazares *et al.*，1999）。在发育着的胚乳中，即使细胞核也能通过胞间连丝（Zhang *et al.*，1990）。现在逐渐认识到，在发育过程中，细胞间存在着选择性的大分子的信息交流。正如Hull（1991a）所指出的，在发育过程中促进胞间连丝开启的寄主基因已经被病毒获取并进行了改造以促进病毒在成熟叶片细胞中移动。然而，据推测，在这些叶片细胞间的信息交流是由胞间连丝的SEL控制的，SEL长时间的增加是非常有害的。因此，至少一些病毒具有某些机制，在侵染前沿短期内打开胞间连丝。在烟草中，TMV P30的磷酸化和在胞间连丝颈部的定位以及在拟南芥中其氨基末端的切割（N-terminal cleavage）可能就是使该蛋白质失活的机制。尽管我们正在获得病毒在细胞中如何运转到胞间连丝的图景，但对移动蛋白如何增加胞间连丝的SEL却知之甚少。

对病毒移动的研究已经鉴定了病毒必须通过的多种组织障碍。值得注意的是那些在维管束鞘内表面和病毒进入伴胞时要越过的组织障碍。过去认为，病毒进入筛分子，特别是移动出筛分子时可能遇到障碍，因为在筛分子中只有很少甚至没有活的细胞质，病毒基因组在此不能表达任何蛋白质以促进其卸出筛分子。然而，近来的研究表明，一些胞间连丝的SEL比较大，可能并不成为明显的障碍。

对病毒长距离移动的实验研究已经揭示了许多关于光同化物源和库、韧皮部装入和

卸出的详细信息。这也能够解释为何那么多病毒诱发产生花叶或斑驳症状（或在单子叶植物上的线条状症状）。但是，还有很多问题需要回答，如病毒如何由外韧皮部移动进入内韧皮部。

病毒的最终分布，无论是在植物自身的宏观尺度上还是在组织和细胞水平的微观尺度上，都受到植物种间各种不同因素的影响。这些因素将决定一种植物是否是寄主，以及如果是寄主，病毒能否进行系统移动、移动到植物的哪些部位等。这些因素包括病毒MP（s）与寄主的适应性、寄主的发育阶段、寄主的营养和水分状况以及病毒与寄主防卫系统的相互作用。受侵染植物的最终表现是所有这些因素以及其他动态变化因素共同作用的结果。

日益明显的是，与植物编码的蛋白质功能的联合和相互协调一样，病毒基因编码的蛋白质的功能也是紧密联合的（参见第13章）。例如，TMV的复制和细胞间移动是紧密相连的，双生病毒也是如此（Mas and Beachy，1999；Lazarowitz and Beachy，1999）。这并不令人惊奇，可能在所有病毒中均发生这种情况。

第Ⅲ节　对植物代谢的影响

在第3章第Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ节中所讨论的病害的各种宏观和微观症状均是由病毒直接或间接导致的生物化学的异常引起的。在早期，许多工作者描述了健康组织和病毒侵染组织在组成或一些过程速率上的差异。通常研究的方面包括总碳水化合物和糖，总氮量和各种氮比例，碳氮比，总灰分或各种灰分成分，光合、呼吸和蒸腾速率。常常利用含有各种化合物（如可溶性氮）的部分进行估计。大多数分析工作采用完全被侵染（可能是在接种多周后）的植株进行的。在这样的植株中，我们期望发现许多物质在数量上的变化以及主要生化过程速率的变化。若为了获得病毒侵染对寄主代谢的影响和病害过程起始的详细信息，这些早期的工作实际上是没有用的。

A. 实验中的变量

用来研究病毒侵染对寄主植物代谢的影响的实验系统和第8章中描述的用于病毒复制研究的实验系统非常相似。一个有效的细胞培养系统对研究被侵染细胞的一些代谢方面非常有用。然而，更多的证据表明在分离细胞过程中，原生质体处于一个被打乱的、变化的代谢状态，利用这样的细胞研究病毒侵染对代谢影响所得的结果加以解释时必须谨慎。

在利用完整的植物或器官研究时必须考虑到许多变量。下面的讨论主要集中于叶片中发生的变化，因为叶片构成了草本寄主植物的大部分。在叶片中通常可产生更多的病毒，而且对实验工作非常有用。在研究病毒侵染对寄主代谢影响的实验设计中要考虑的3种变化因素是：①结果表示的基础；②材料中随时间变化的因素；③特定时间取样时材料的不一致性。

1. 表示结果的基础

用于表示实验结果要素的度量单位包括单位叶片面积或者每个植株、片叶或者每个

细胞的组织鲜重、干重、蛋白质氮和DNA含量。鲜重是最方便的度量单位，已被广泛使用。当用于探索病毒侵染极早阶段的差别这种方法比较合适。但是，病毒侵染能够在侵染后很快改变组织水分。在后来，当植物生长发生迟缓时，利用鲜重就遇到了严重的困难。因为病毒侵染的叶片小于同一叶龄的健康叶片，因此每单位鲜重中很多组分可能含有更高的浓度。采用干重可能引起严重的不确定性。病毒在叶片干重中能占到约10%。植株的矮化可能会导致无活性细胞壁物质比例的提高，并且因病毒侵染引起的淀粉积累能够增加植株的干重。同样地，病毒的存在与矮化能显著影响蛋白质氮含量。每个细胞中DNA含量保持不变，为其他物质含量的比较提供了合适的基础。

在病毒侵染还没有改变叶片面积的前提下，叶片面积是一个合适的测定单位，如在接种后的早期。叶片面积测定法用于因病缩小的叶片，结果就可能没有意义。基于每一株植物的测定对于检测慢性侵染的材料非常合适，如从侵染的块茎生长出来的马铃薯植株。相应于寻求病害的经济方面的信息，整株植物或者有经济价值的器官将是最适宜的单位。然而，当用整株接种的植物时，样品必须包括在不同时间段受到影响的组织。

对许多研究目的来说，叶片是最合适的计算结果的测定单位，特别是在侵染前到病害发展过程中，以及叶片扩展的情况下。在用到组织切碎物或在组织培养中生长的细胞的实验中可以选择细胞作为单位。可能没有理想的方法来表示结果，因此，一般而言，建议对同一实验材料使用两种或更多的测定标准。

2. 材料中随时间变化的因素

a. 叶龄

对实验中用于病毒侵染的大部分草本植物来说，其单个叶片不会处于稳定状态。它们通常经过4个阶段，上一个阶段与下一个阶段重合。第一阶段是像烟草这类植物的叶片长到2 cm长时的细胞强烈分裂期。随后的一个阶段（第二阶段）中，细胞伸展和蛋白质合成成为主要活动。当叶片接近成熟期大小时（第三阶段），光合作用和同化物的输出变成主要活动（尽管在前一个阶段这一活动已经在进行），最后（第四阶段）叶片开始衰老。病毒在叶片发育过程中的不同阶段侵染叶片将遇到不同的条件，并且对细胞生理过程有不同的影响。

b. 昼夜变化

在日光下生长的植物叶片有许多基本生理过程有一个昼夜节律（diurnal rhythm）（Millar，1999）。例如，大致反映叶片蛋白合成速率的在多核糖体形式核糖体的比例遵循昼夜循环，在夜晚结束时达到最小值，在接近中午时达到最大值（Clark *et al.*，1964）。病毒在一天中不同的时间侵染可能产生不同的直接影响。不同种植物间的昼夜节律有差异（Oberschmidt *et al.*，1995）。

c. 季节变化

在自然条件或部分控制的温室条件下，一年中不同时间生长的植物在许多特征上是不同的，病毒侵染时会有不同的影响。在全部控制的环境条件下自种子开始生长的植物可以减少这种不同。

d. 伤害反应

健康组织一旦被切除或受到伤害，代谢变化就改变了同位素标记的代谢物吸收速率

以及与呼吸相关的途径（Macnicol，1976）。

3. 特定时间取样时材料的不一致性

a. 不同叶片间的不一致性

两片初生叶间的变异最小，对于菜豆等植物而言，是有用的实验材料。除了初生叶外，在病毒研究中用到的许多植物上没有两片叶处在完全相同的发育阶段。这种变异在一定程度上可以通过利用一组植物并选择特定大小的叶片来克服。即使这样，一组叶片中也很少有叶片会处于完全相同的发育阶段，因为不同植株上的叶片的起始就不是同步进行的。在快速生长的植物中，如白菜，幼嫩叶片在 30～40 h 后就增加 1 倍，这就要求在一大组植物中选取少量植株来获得相当一致的幼嫩叶片。

b. 叶片中的不一致性

叶片中相对于中脉对称的位置通常是很相似的，因此在比较研究中，有意义的样品来自沿中脉纵向切下的半叶。但是，在半叶中，组织通常是不相同的。叶尖要老于叶片基部。叶片厚度和脉络模式也不同。在叶片不同部分间放射性标记复合物吸收的速率也不是不变的。而且，如第Ⅱ节 I.3 中讨论的，病毒在整个叶片中的侵染是不一致的。

c. 细胞类型

叶片组织通常由高比例的叶肉细胞构成，但表皮细胞和表皮附属物却构成了10%～15%的干重。如果中脉和主脉比较大，在病毒侵染的生化研究中通常被舍弃，除非对它们有特别的兴趣。

d. 花叶症状中的不一致性

如第 10 章第Ⅲ节 P 和本章第Ⅳ节 D 所述，表现花叶症状的叶片中的组织对于病毒侵染可能是很不一样的，这种不同仅仅通过显微镜观测就能检测到。例如，在 TYMV 引起的花叶症状中，暗绿区域能用作病毒长期慢性侵染对细胞组分和生理过程影响研究中的对照。自一半叶片中取出暗绿区域，在另一半叶片中取出相应的含有病毒的区域。

e. 细胞器间的不一致性

在高等植物中，分离的和完整的叶绿体经常在密度梯度离心中分成两条或更多条带。在一些高等植物中，已经观察到通过不同路线固定碳的两种形态类型的叶绿体（Slack，1969）。因此，叶绿体间正常的变化使得对病毒侵染引起的代谢影响研究变得复杂。

f. 离体叶片中的变化

经过短暂的培养，离体叶盘，即使是很小的叶盘，边缘区域和中央区域在多种代谢活动上发生了明显的变化（Pratt and Matthews，1971；Macnicol，1976）。

B. 核酸和蛋白质

病毒核酸与蛋白质的合成和表达在第 7、8 章已经讨论过。这里将讨论病毒侵染对寄主细胞核酸和蛋白质合成的影响。

1. DNA

一般认为小 RNA 病毒对寄主细胞 DNA 合成几乎没有影响，但在这个问题上仅有

很少的几个确定性实验。病毒侵染可能对寄主细胞DNA合成有一些影响，但这些影响可能很小并且难于观测，因为①在一个正常伸展的叶片中每个细胞的DNA成分在一段时间中是增长的；②次要DNA组分，可能受病毒侵染影响，但是难以分离和鉴定；③这些影响的时间可能非常短，因此难以在不同步侵染中检测。利用放射自显影技术来分析单个细胞中的DNA合成，Atchison (1973) 发现TRSV侵染菜豆根部时，其端部1 mm处DNA的合成降低。随后有丝分裂指数发生了瞬间的降低。

2. 核糖体和核糖体RNA

病毒侵染对核糖体RNA的合成和核糖体浓度的影响因病毒、病毒株系和侵染后时间以及相关寄主和组织的不同而异。另外，70S和80S核糖体可能受到不同的影响。

在TMV侵染的叶片中，病毒RNA可能占到总核酸的75%，除引起16S和23S叶绿体核糖体RNA的减少外，对主要的寄主RNA组分没有明显的影响（Fraser, 1987b）。然而，在一些情况下，细胞质核糖体RNA合成也被抑制。在花叶病中，叶绿体核糖体的减少而对细胞质核糖体没有明显影响是一个相当普遍的特征（如BSMV侵染大麦，Brakke *et al.*, 1987b；TYMV，见后面的讨论）。

Fraser (1987) 已经讨论了对TMV侵染影响细胞质和叶绿体核糖体结果的变量。在TYMV的实验中将列举出概括这些变量的难点。

在TYMV长期侵染的大白菜叶片中，花叶症状中黄绿组织中的70S核糖体的浓度相对于同一叶片中的绿岛组织大大降低（Reid and Matthews, 1966）。在黄绿组织中对细胞质里核糖体的浓度几乎没有影响。70S核糖体浓度降低的程度取决于TYMV的株系，并且在侵染后随时间延长而变得更加严重。在引起更严重损失的TYMV“白色”(white) 株系中，70S核糖体的损失基本上与叶绿素的减少一致。

在系统侵染的幼嫩叶片中对TYMV侵染引起的影响加以跟踪，得到了一个与上述情况不同的结果。叶绿体中的核糖体浓度在病毒浓度达到高峰时显著降低。大约在同一时间，细胞质中核糖体的浓度显著提高，这主要是因为侵染引起的矮化作用。在另一方面，如果把病毒侵染对这些组分的影响综合考虑，又获得了不同的结果。侵染既导致了细胞质核糖体的减少，也导致了叶绿体核糖体的减少。

这些结果强调了这一事实，即病毒对正在生长的植物的侵染向一个包括许多正常的互作组分随时间而变化的系统中引入了另一个依赖于时间的变量。仅靠对这个系统中的一个或两个组分的分析，或者在一些特定时间的分析，不能深入研究病毒复制和发病过程的本质。我们对病毒侵染对寄主的tRNA、细胞核RNA以及线粒体中rRNA的影响还知之甚少。下一部分将讨论在蛋白质合成方面对寄主mRNA的影响。

3. 蛋白质

一种病毒（如TMV）的外壳蛋白，在病叶中可以占到叶片总蛋白量的大约50%。在发生这样的情况时，对寄主蛋白质的总量可能没有明显的影响。但是，其他大多数病毒的增殖只能达到一个很有限的程度。对寄主蛋白质的影响与产生的病毒的数量没有必然的联系。最丰富的寄主蛋白质核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶（rbcs或rubisco）在数量上的减少是引起花叶和黄化病的病毒的最普遍的影响（如TYMV，Reid and Mattews,

1966；WSMV，White and Brakke，1983）。

Fraser（1987b）估计到在病毒复制期，TMV 侵染可使寄主蛋白质合成的减少最多达 75%。病毒侵染不改变寄主多聚腺苷酸 RNA 的浓度，或其大小的分布。这表明病毒侵染可能在翻译阶段改变寄主蛋白质的合成而不是干扰转录。Stratford 和 Covery（1988）发现 CaMV 侵染芜菁叶片时，特异性可翻译的（translatable）mRNA 的水平有变化。在强株系侵染时发现了更多这样的变化。特别是强株系侵染使编码 rbcs 小亚基前体的 mRNA 明显减少。Saunders 等（1989）针对同样的问题采用了另一种方法。他们在 CaMV 侵染芜菁叶片导致脉明阶段的早期分离出寄主 RNA 并构建了其 cDNA 克隆文库。用杂交方法来筛选代表了病毒侵染引起的水平升高或降低的 RNA 的克隆。总之，Stratford 和 Covey（1988）以及 Saunders 等（1989）的发现说明在 CaMV 侵染期间寄主基因表达的明显变化很少。

在对 PSbMV 的详细研究中，Wang 和 Maule（1995）、Aranda 等（1996）以及 Maule 等（2000）利用病毒基因组的正义和负义探针通过原位杂交鉴定了豌豆子叶中的侵染前沿（infection front）。检测到病毒的负链 RNA 就被认为发生了病毒的复制。随后他们探测了各种寄主基因 mRNA 的存在（图 9.23），并确定了 3 种情况：

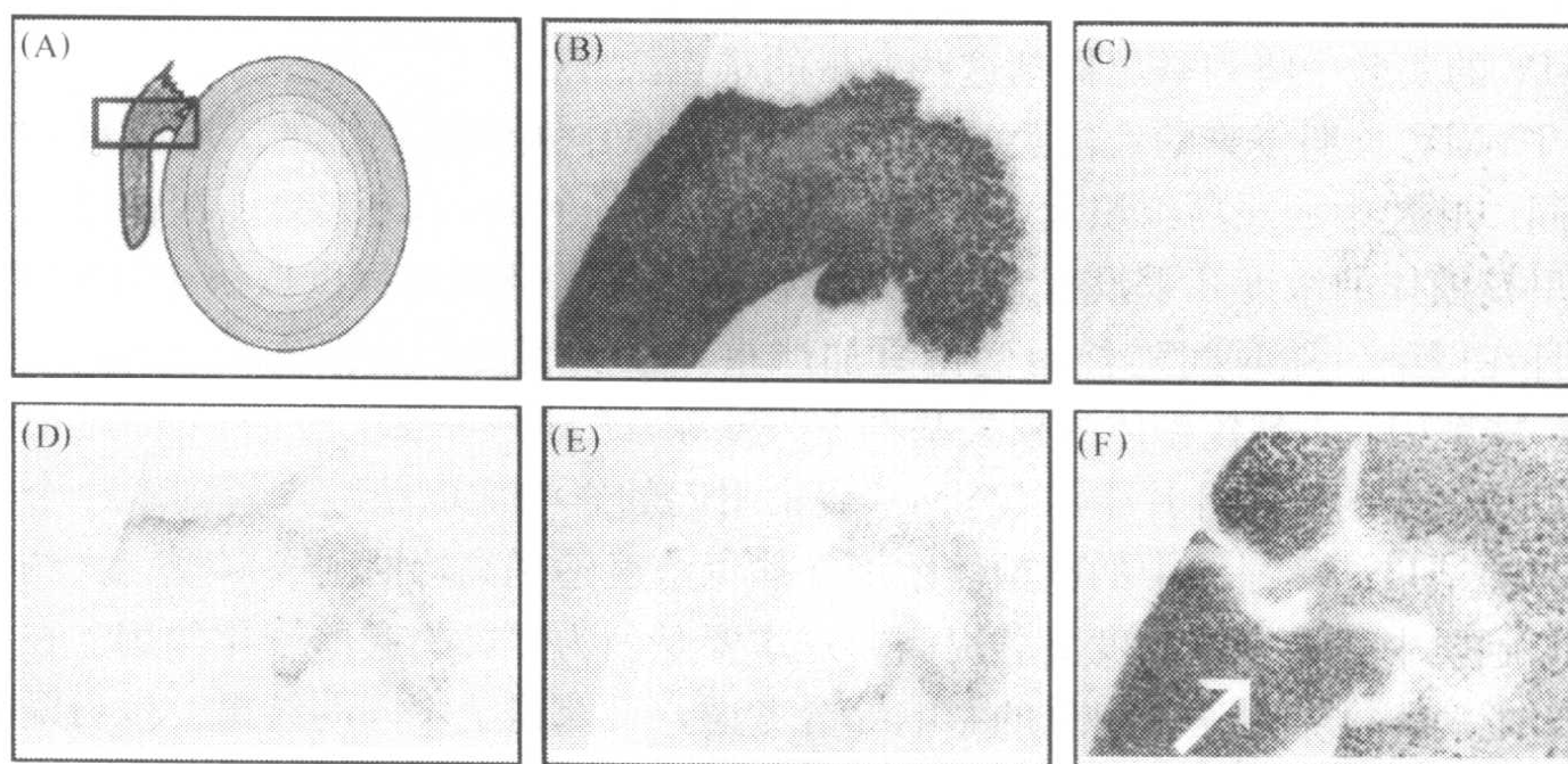


图9.23　细胞基因的关闭以及与 PSbMV 复制相关的 HSP70和多聚遍蛋白的诱导。图中表示的是 PSbMV 侵染的梨组织切片近连续部分的原位杂交的结果。在组织切片上用黑色表示特定 RNA 的特定检测。(A) 一颗梨种子的切面；在其他图中出现的组织部分用方框圈出；(B)检测病毒基因组正链 RNA；(C)在病毒 RNA 正在复制或近来正在复制的细胞中检测病毒负链 RNA；(D)～(F)分布检测 HSP70、多聚遍蛋白素以及脂氧化酶 RNA。脂氧化酶探针记录了关闭效应。HSP70和多聚遍蛋白基因的诱导发生在基因关闭的区域和病毒 RNA 复制的区域(Aranda *et al.*，1996)。在这个例子中，两种现象，关闭和诱导发生在一个复杂结构的组织中，相应于成熟植株不同营养组分的细胞类型同样受到影响。注意在受影响区域中基因关闭的恢复(脂氧合酶表达的恢复；箭头所指)。经允许，引自 Aranda 和 Maule (1998)。

（1）至少有 11 种寄主基因的表达受到了抑制，如脂氧合酶 1（lipoxigenase 1）和热激蛋白 HSC70［图 9.23（F）］。

（2）随着病毒复制诱导了热激蛋白 HSP70 和多聚泛素的表达［图 9.23(D) 和 (E)］；但是，病毒复制对 HSP70 的诱导不同于热对 HSP70 的诱导（Aranda *et al.*，

1999）。

（3）对寄主基因表达没有影响，如肌动蛋白和β-微管蛋白。

利用抗体探测侵染前沿表明寄主蛋白质的积累也以类似的方式受到影响。在某些方面，植物病毒类似于多种动物病毒（Aranda and Maule，1998）。但是就同一病毒而言这3个现象是不同的。这些观察提出了一些问题（Aranda *et al*.，1996），它们包括：

（1）病毒是否会关闭一些可以认为是“竞争性的”基因的表达而增强其他“有用的”基因的表达？

（2）这一现象是局限于子叶还是在整个植株的侵染前沿中的一个普遍机制？

（3）如果它是普遍的，是否可能与症状表现相关联？

C. 脂类物质

细胞中病毒合成的位点几乎总是含有膜结构（参见第8章）。TYMV侵染改变了叶绿体膜的超微结构，弹状病毒和番茄斑萎病毒属成员的粒体通过出芽穿过一些寄主细胞膜而获得其外被膜（outer membrane）。已经有一些关于病毒侵染对脂质代谢影响的研究（Trevathan *et al*.，1982），但没有一项阐明了病毒改变和利用植物膜系统的机制。

CaMV侵染拟南芥时可刺激脂转移蛋白质（lipid transfer protein）的表达（Sohal *et al*.，1999），该类蛋白质可能参与植物抵抗细菌和真菌侵染的防卫反应。

D. 碳水化合物

一些病毒对叶片中碳水化合物几乎没有影响，但一些病毒却可以改变碳水化合物合成和转运的速率。这些变化可以以简单方式列出。在上午或黑暗处理几小时后收集几天前病毒接种的还没有引起局部坏死斑的叶片，脱色，用碘酒处理。在淡背景下染黑区域表示的局部枯斑表明碳水化合物转运中的一块区域。另一方面，如果在下午经过光合作用期后采集接种叶片，脱色，用碘酒染色，成为淀粉斑的局部斑在未被侵染组织的黑背景下显现为淡色斑点（Holmes，1931）。因此，当叶片暴露于光下时，病毒侵染能够降低淀粉积累的速率。

CMV侵染西葫芦（*Cucurbita pepo*）子叶时导致淀粉斑的形成。Técsi等（1994a）利用免疫定位方法检测了病毒在这些淀粉斑中的分布，并且与淀粉积累、$^{14}CO_2$同化和叶绿素a淬灭（quenching）相关。这一分析揭示了在空间和时间上复合的不同生理学的细胞类型的排列（图9.24）。

病毒积累在由4个同心区域构成的病斑的边缘最多（图9.24）。

由于病毒的浓度分布并不与这4个区域相关，因此看来生理学变化不太可能是病毒复制的直接结果。

一些病毒如BYV的侵染能够导致限制光同化物转运的韧皮部的损伤。这些影响在叶片中积累并可能产生一些症状，如叶片加厚和卷叶等。

从不多的已被详细研究的病害不可能概括出其他碳水化合物的变化，只能看出下面一些相当普遍的影响：①病毒侵染叶片中葡萄糖、果糖、蔗糖的升高；②特定病毒弱毒株系要比强毒株系引起的糖类物质升高的更多；③病毒侵染对叶肉细胞的影响，还没有理解，但可能减少碳水化合物转运出叶片。

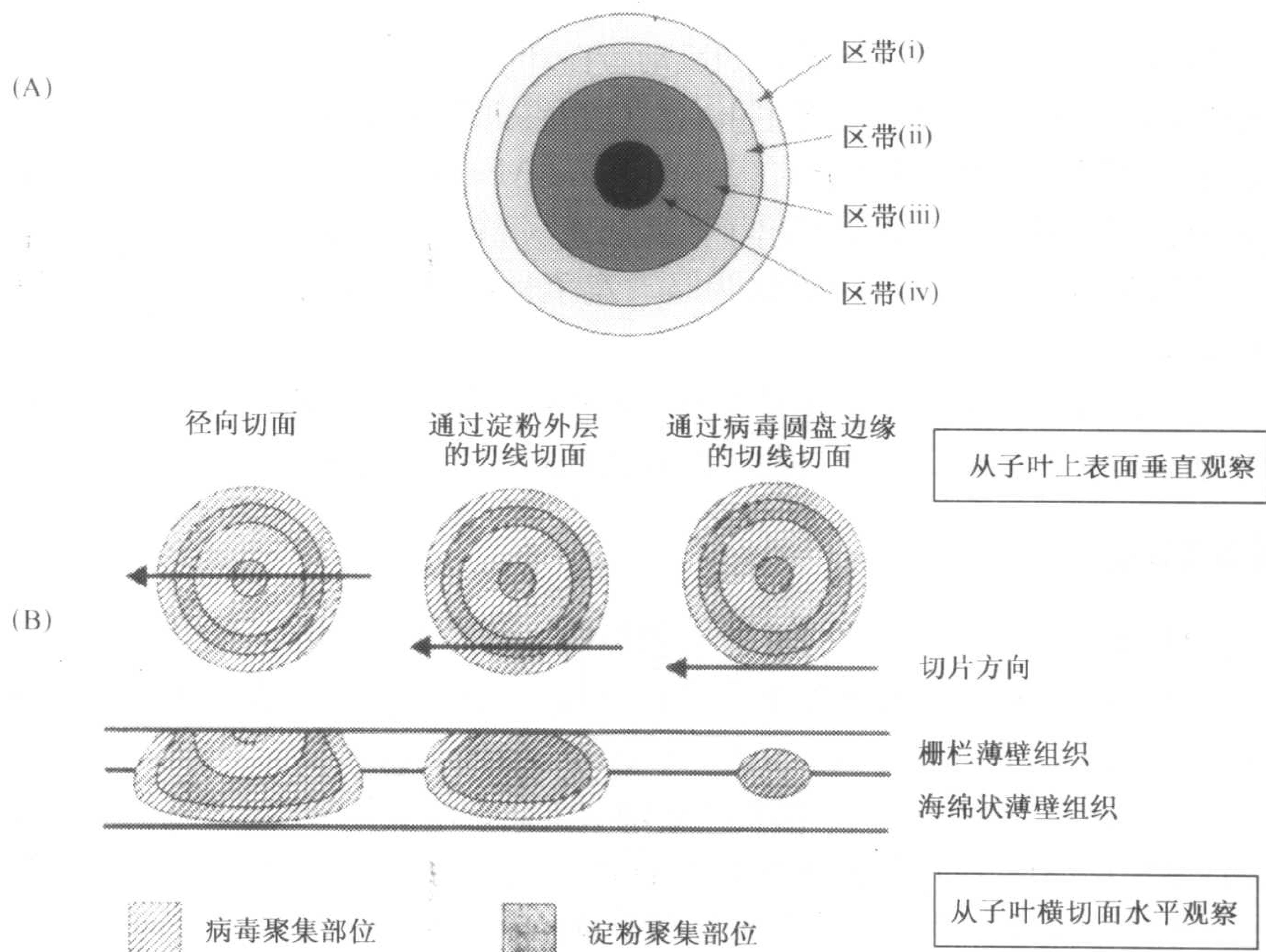


图9.24 西葫芦(*C. pepo*)上一个褪绿斑中CMV、淀粉、植物化合物以及代谢物的分布情况。(A)侵染4天后，一个褪绿斑中CMV、淀粉、叶绿素a荧光、^{14}C和褪绿症状的分布。自外向内，侵染区是这样组成的：①光合作用水平升高但还没有产生高水平淀粉的细胞区域；②区域外缘的细胞光合作用活性高（叶绿素荧光快速淬灭，CO_2同化率高）而淀粉积累少，而内缘细胞具有高淀粉含量；③正在褪绿的无淀粉的细胞区域，光合作用活性低（叶绿素荧光淬灭慢，CO_2同化率低）；④光合作用活性高和淀粉含量高的、相对稳定的一组受侵染细胞。(B)一个褪绿斑中淀粉和病毒的分布。在褪绿斑中病毒的积累先于淀粉的积累。在径切面(radial section)可观察到中心圆点和环。在穿过淀粉外环的切面，仅能观察到淀粉环，在穿过病毒圆盘边缘的切面观察不到淀粉的积累。承蒙版权所有者(Blackwell Science Ltd)惠允，引自Técsi等(1994a)。

E. 细胞壁化合物

尽管细胞学研究已经证明在许多病毒侵染中细胞壁的超微结构发生改变，但这些变化的生化基础却是难于研究的。与病毒细胞间移动相关的胞间连丝的变化已在第Ⅱ节D中描述。将来的工作可能发现病毒侵染对代谢不活跃的细胞壁成分的各种活性的影响。85%可检测的过氧化物酶的活性和22%的酸性磷酸酶定位于健康烟草叶片的细胞壁(Yung and Northcote，1975)。已经有了烟草和其他许多寄主因受病毒侵染而过氧化物酶活性提高的报道(Matthews，1981)。

F. 呼吸作用

关于病毒侵染对呼吸作用途径和速率的影响已有许多研究，但还不能将这些结果和病毒复制的过程相联系。概括而言，在许多发生坏死的寄主-病毒相互作用中，从症状

出现前以及在发病的一段时间内，呼吸速率上升。在慢性侵染的植物中，呼吸作用经常比正常值低。在目前深入研究的一个系统病害中，没有检测到呼吸途径的变化。在产生局部坏死斑的寄主-病毒相互作用中，随着坏死的发展，呼吸增加。呼吸的增加至少部分是由于已糖磷酸支路（hexose monophosphate shunt）的激活（Matthews，1981；Fraser，1987b）。

通常对呼吸作用和其他代谢领域分开进行研究。Técsi 等（1994b）详细测定了 CMV 侵染对西葫芦子叶的影响，估计了病毒侵染对呼吸和光合作用速率以及主要代谢酶活性、可溶性和不可溶碳水化合物、氨基酸、有机酸和蛋白质合成变化的影响（图 9.25 和图 9.26）。

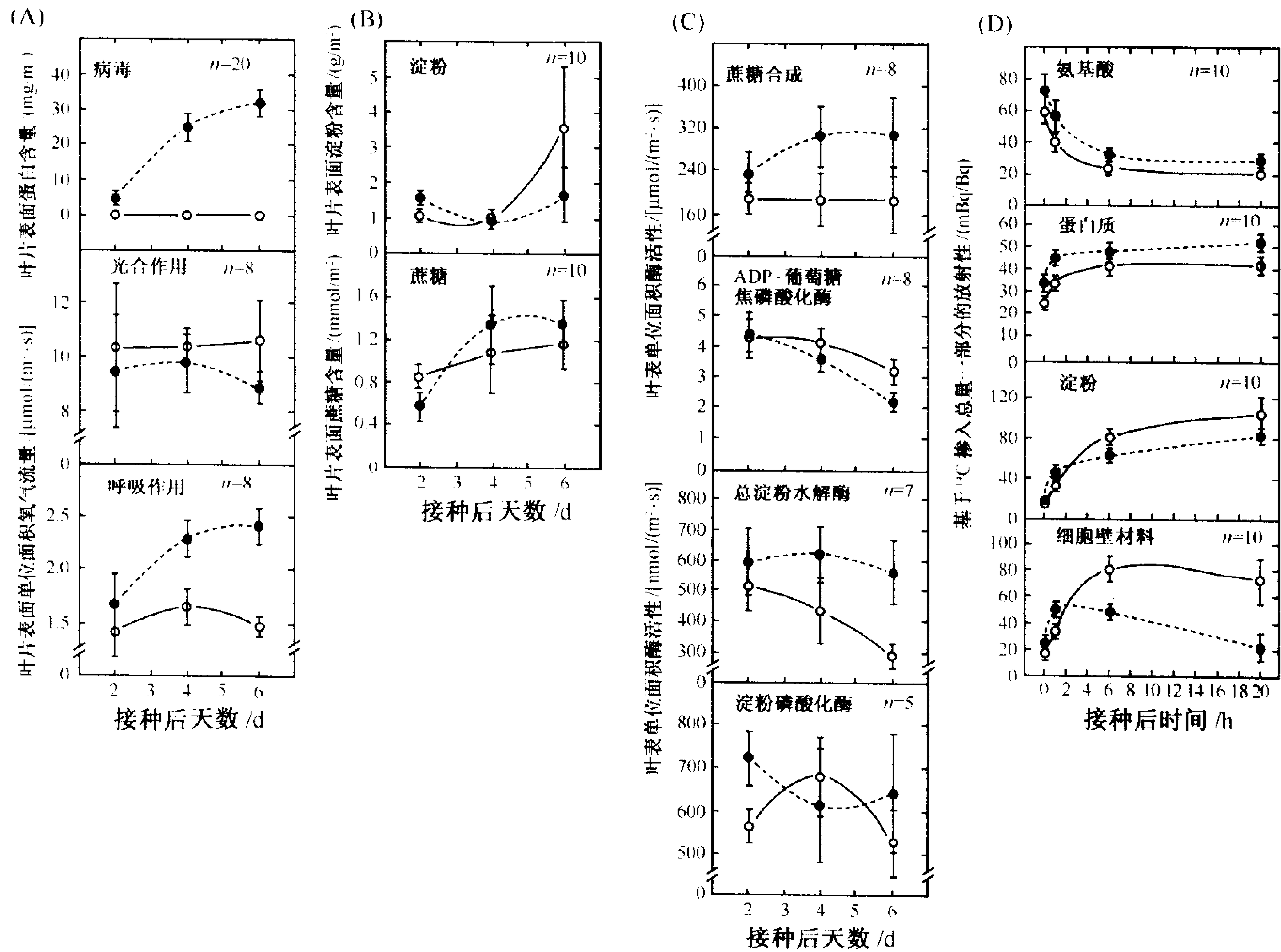


图9.25 CMV 侵染对子叶代谢的影响。(A)病毒含量、光合氧变化和呼吸氧吸收；(B)淀粉和蔗糖含量；(C)参与蔗糖代谢(蔗糖合成酶)和淀粉代谢(ADP-葡萄糖焦磷酸化酶)的酶的最大催化能力；(D)在脉冲-追击(pulse-chase)实验中$^{14}CO_2$掺入进氨基酸、蛋白质、淀粉和细胞壁物质中。○未被侵染的子叶；●，侵染的子叶；曲线上的线条表示置信区间在90%水平，n 表示独立实验重复的数目。经允许，引自 Técsi 等(1994b)。

本节 D 部分介绍了淀粉斑（starch lesion）中的光合作用和淀粉积累。在研究整个子叶时，Técsi 等（1994b）发现在病毒侵染早期典型的淀粉积累在后期就发生了逆转，其减少与淀粉合成能力（ADP-葡糖焦磷酸化酶）的降低和淀粉降解能力（总淀粉水解酶、淀粉磷酸化酶）的升高相关。新吸收的碳从侵染的子叶中以较低的速率丢失，较少掺入到结构性碳水化合物，包括有机酸的磷酸化中间体中，较多地掺入到可溶性糖、氨基酸和蛋白质中。在随后的侵染中，呼吸能力显著增加，实质性改变了刺激氧化戊糖磷

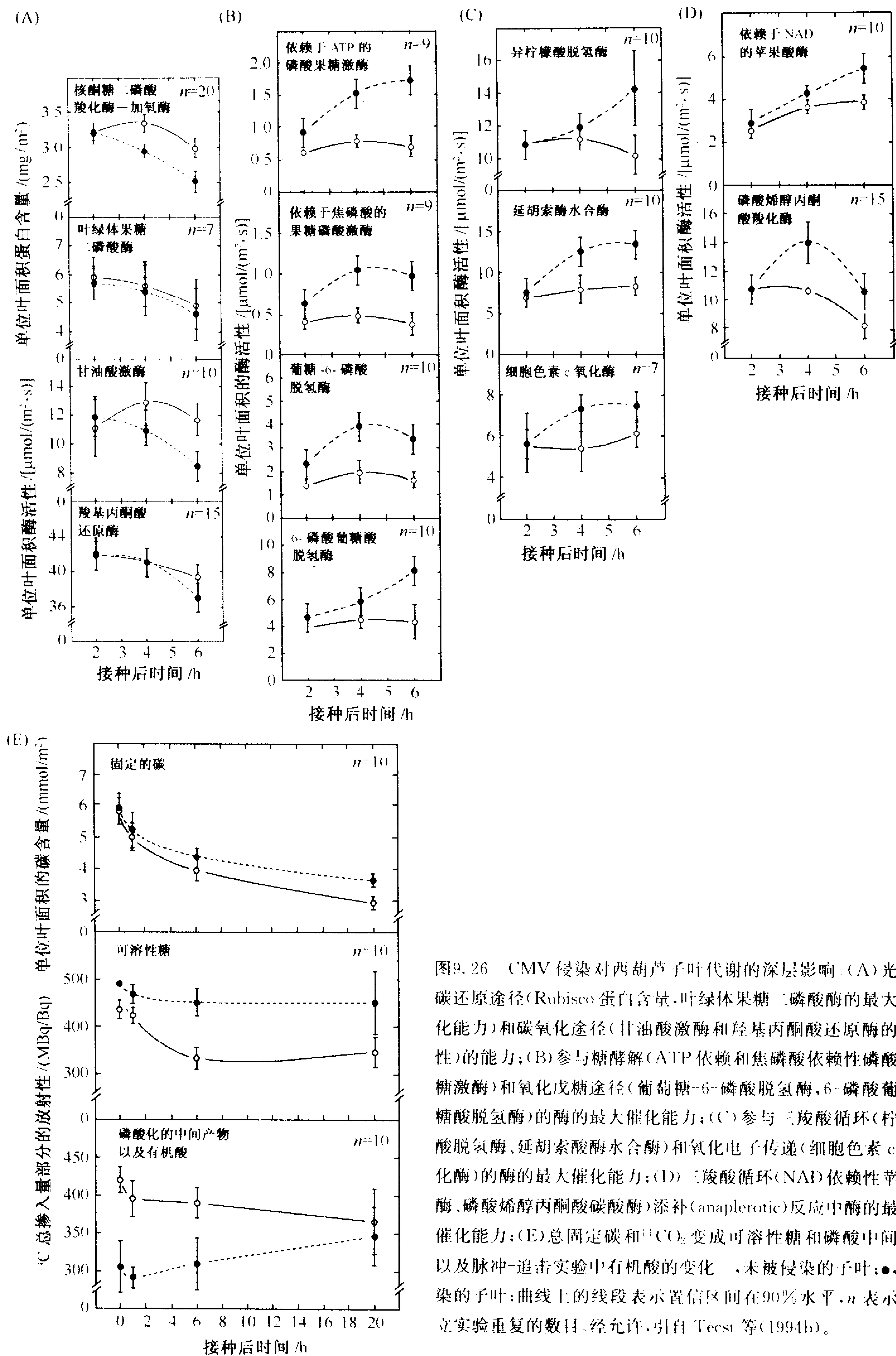


图9.26 CMV侵染对西葫芦子叶代谢的深层影响。(A)光合碳还原途径(Rubisco蛋白含量,叶绿体果糖二磷酸酶的最大催化能力)和碳氧化途径(甘油酸激酶和羟基丙酮酸还原酶的活性)的能力;(B)参与糖酵解(ATP依赖和焦磷酸依赖性磷酸果糖激酶)和氧化戊糖途径(葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶)的酶的最大催化能力;(C)参与三羧酸循环(柠檬酸脱氢酶、延胡索酸水合酶)和氧化电子传递(细胞色素c氧化酶)的酶的最大催化能力;(D)三羧酸循环(NAD依赖性苹果酸酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶)添补(anaplerotic)反应中酶的最大催化能力;(E)总固定碳和$^{14}CO_2$变成可溶性糖和磷酸中间物以及脉冲-追击实验中有机酸的变化。○,未被侵染的子叶;●,侵染的子叶;曲线上的线段表示置信区间在90%水平,n表示独立实验重复的数目。经允许,引自Técsi等(1994b)。

酸途径、糖酵解、三羧酸循环、添补反应（anaplerotic reaction）和氧化电子传递能力相应的碳水化合物代谢。虽然没有完全改变光合作用速率，但侵染可能降低［核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶（Rubisco）和甘油酸激酶（glycerate kinase）］或者不影响（叶绿体果糖二磷酸和羟基丙酮酸激酶）光合作用碳还原途径和光合作用碳氧化途径的能力。

G. 光合作用

烟草的一个突变体，其叶片的一些区域没有叶绿素，TMV 能够在完整植物叶片白色区域进行复制。但是，如果将白色组织分离并加以接种后立即漂浮在水中，病毒就不能复制（Matthews，1991）。依赖葡萄糖维持的分离的白色组织能够支持 TMV 复制，表明光合作用过程自身并不是 TMV 复制所必需的。不过，病毒侵染通常影响光合作用过程。最经常报道的是在表现花叶或黄化病的叶中碳的固定率降低。这种降低通常在接种几天后即可检测到。

叶绿体结构的变化、光合色素或 Rubisco 成分的减少或者与光系统Ⅱ颗粒相关的特异性蛋白质的减少均能降低光合作用能力（Naidu *et al.*，1986）。然而，这些变化似乎是次要的，发生在侵染后病毒已经开始合成的若干时间。在 TMV 不同株系侵染的烟草植株中，当叶绿素损失发生时电子转运速率降低。在接种叶中，即使没有明显的肉眼可见的症状，光系统Ⅱ的损伤看来也是不能挽回的（van Kooten *et al.*，1990）。利用分离的叶绿体进行实验，观察到 TMV 在局部和系统侵染的烟草中引起的多种影响。但是，一些酶的活性几乎不受到影响（Montalbini and Lupattelli，1989）。

已知的一些对光合作用的影响似乎与病毒生产量最高的早期紧密相连。在分离自 TYMV 侵染的大白菜叶片的叶绿体中，在病毒增殖的活跃阶段，希尔反应和循环性以及非循环性的光合磷酸化均增加（在等量的叶绿素基础上）（Goffeau and Bové，1965）。在侵染的后期阶段，在分离自完整植株的叶绿体上测量的光合作用活性比对照低。在 TYMV 侵染的大白菜幼嫩叶片中，观察到光合作用碳固定产物确实从糖转化为有机酸和氨基酸。这一变化在病毒快速增长期最明显，在病毒复制接近完成时返回到正常模式（Bedbrook and Matthews，1973）。磷酸烯醇丙酮酸羧化酶（phosphoenolpyruvate carboxylase）和天冬氨酸转氨酶活性的增加具有相似的时程（time course）。

Magyarosy 等（1973）发现在 SqMV 系统侵染的南瓜植株中也存在从糖的生产到氨基酸和有机酸生产的类似变化。他们自健康叶片和感病叶片分离了叶绿体，发现二者在碳固定产物上均产生类似的模式并且固定的总碳量基本一致。他们推断病毒诱导的氨基酸的产生发生在细胞质中。

在上面本节 D 部分已描述了 CMV 侵染西葫芦子叶引起的淀粉斑中光合作用的变化，本节 F 部分描述了整个子叶中的变化。

Izaguirre-Mayoral 等（1993）描述了两种兰花中 TMV（兰花株系）和 CymMV 的侵染对景天酸代谢（crassulacean acid metabolism，CAM）的影响。在两种植物中，TMV 显著降低了叶片中的 CAM 活性，在一种植物中 CymMV 几乎完全抑制了可滴定酸度（titratable acidity）的昼夜变化。这些变化与病毒侵染的叶片中叶绿体超微结构的变化相关。

概括而言，在病毒快速复制期，病毒侵染可以导致碳固定的早期产物自糖转换到引

起更直接合成核酸和蛋白质材料产生的途径。病毒侵染最普通的结果是光合作用能力的降低，但CMV侵染西葫芦子叶时，在侵染的早期阶段没有全面的影响。光合作用的任何减少可能来自多种生化和物理变化。不同因子的相对重要性随病害而变化。

H. 蒸腾作用

在病毒长期侵染的叶片中，已经发现蒸腾速率和水分通常比相应的健康组织低。所报道的在接种后最初1～2周的影响是不同的。因为实验中使用的不同病毒和寄主品种以及不同的生长条件和不同的组织取样程序，使得结果难以比较和解释。

Bedbrook（1972）利用氯化钴纸法（cobalt chloride paper method）（Stahl，1894）来估计相对蒸腾速率并测量气孔的开放情况。他在大白菜植株上比较了由于TYMV侵染表现花叶的叶片上的绿岛组织和完全被病毒侵入的各种组织。在黑暗或低强度光照条件下，暗绿和淡绿组织的气孔关闭了，而在受到更严重影响的叶片上绿岛中的气孔是开放的。在日光下放置的植物中，暗绿和淡绿岛的蒸腾速率很高。而受到严重影响的岛中的蒸腾要慢得多。这些实验以及其他实验表明TYMV侵染降低了气孔对光强度的反应能力，在强烈引起叶绿素减少的株系中对光反应能力的降低更突出。因为蒸腾减少，BNYVV侵染的感病甜菜叶片的温度比抗病品种的叶片温度高2～3℃（Keller *et al.*，1989）。

I. 特异性酶的活性

由于以下原因使得许多关于病毒侵染对特异性酶的影响的结果难于解释：①在发现差异时，通常认为病毒侵染改变了酶的总量，很少考虑到侵染可以通过细胞受到破坏时释放的酶的抑制剂或激活剂（activator）量的改变而影响酶活性的可能性；②对确定表达酶活性的适当基础的难度经常受到忽略；③大部分工作是在认识到同工酶广泛存在之前进行的；④在大多数情况下，酶活性研究没有与相关的或相伴随的活性研究相结合。

已有许多研究利用聚丙烯酰胺凝胶电泳来分开和分析同工酶并研究病毒侵染的结果。通过这种方法获得数据相对容易，但对所观察到的变化提供有意义的解释却不那么容易。这些困难主要是因为：

（1）健康植物中可能存在着一个持续变化的同工酶发展顺序（Denna and Alexander，1975）。

（2）电泳可区分开的同工酶可以通过遗传学研究或通过来自相同一级结构、经翻译后修饰的不同构象形式来确定。

（3）在正常寄主中的同工酶谱带可能会与密切相关的基因型中的同工酶有所不同，因而病毒侵染的影响可能因此存在差异（Esanu and Dumitrescu，1971）。

（4）同工酶可能分布在一些亚细胞位点。例如，一套不同的过氧化物同工酶与细胞壁相关，在正常的玉米根尖抽提液中与可溶性部分相关（Parish，1975）。病毒侵染可以以不同方式影响多种位点。

（5）病毒引起的细胞死亡可以导致同工酶模式的改变，这一变化与完全不相关的原因引起的坏死导致的模式改变没有显著的差异。

（6）观测到的病毒侵染引起的影响可能取决于同工酶分析中所用的底物。

（7）聚合态（如单体-二聚体）可以影响酶的动力学特性，如天冬氨酸转氨酶（Melander，1975）。

本节上面D和F部分描述了CMV侵染西葫芦（*C. pepo*）子叶对酶促作用以及其他活性的影响的综合研究。病毒侵染还能够影响编码酶的寄主基因的表达（参见本节B.3部分）。

涉及过敏性反应和获得性抗性现象中的酶将在第10章（参见第Ⅲ节C、F和G等部分）中讨论。

J. 激素

对病毒侵染可影响罹病植物中的激素活性这一点很少有人怀疑，并且激素部分参与病害的发生。在下一节（参见第Ⅳ节B.1部分）将讨论这一方面。研究已表明病毒侵染对所有主要植物激素的浓度均有影响（Fraser，1987b）。病毒的系统侵染倾向于削弱稳态生长素（steady-state auxin）的水平而导致植物形态上的改变（Pennazio and Roggero，1996）。通常生长素水平降低，但有时在症状严重时观察到生长素活性确实升高。用生长素处理病毒侵染的植物可以阻止病毒复制而降低症状严重度。病毒侵染时赤霉素浓度经常降低，但脱落酸的浓度却提高。细胞分裂素活性可能降低或提高（Pennazio and Roggero，1998）。乙烯合成的刺激与局部坏死或褪绿反应相关。

在过敏性反应中也涉及激素，这将在第10章（第Ⅲ节G）中讨论。

K. 低分子质量化合物

有许多关于病毒侵染对植物各部位低分子质量化合物浓度影响的报道。这些分析产生了大量的数据，这些数据因寄主和病毒的不同而异，因此不可能用于解释与病毒复制的关系。在这一部分中，简要介绍其中一些影响作用。

1. 氨基酸和相关化合物

观察到的最一致的变化是一种或两种酰胺（amide）——谷氨酰胺和天冬酰胺的增加。有报道发现在一些病毒侵染的组织中氨基酸、2-哌啶酸（pipecolic acid）浓度相对较高（Welkie *et al.*，1967）。在病毒快速合成期间，可溶性氮化合物与健康叶片相比通常不足。

2. 含磷化合物

磷是所有病毒的一个关键组分，可以达到叶片总磷量的大约1/5。尽管如此，我们对任何病毒中磷的来源以及病毒侵染对寄主磷代谢的影响尚不清楚。

TYMV侵染大白菜12～20天后取样，发现病毒含磷量的上升伴随着非病毒的不溶性磷的相应下降，表明病毒在利用磷时是以（但不一定是直接来自）叶片中一些不溶性磷酸盐的减少为代价的（Matthews *et al.*，1963）。

3. 叶片的色素

病毒侵染常常产生黄花叶斑驳或者叶片普遍化性黄化。因为叶片中色素的减少，这

些变化是明显的。许多研究者已经测量了病毒侵染对叶片中色素量的影响。通常叶绿素的损失、胡萝卜素和叶黄素（xanthophyll）的增加而使叶片黄化，但叶黄素在一些病害中也减少。叶绿体色素的变化可能是次级变化，因为许多病毒似乎是在细胞其他部分增殖和积累，而且同一病毒的相近株系即使增殖到相同程度，对叶绿体色素的影响亦明显不同。

叶片中色素量的减少既可能是叶绿体发育受到抑制的结果，也可能是成熟叶绿体中色素受到破坏的结果。随着病毒侵染的发展，第一种影响可能在发育着的幼嫩叶片中占据主导地位。成熟的绿色叶片在接种病毒后局部斑经常发生迅速褪绿，这肯定是因为已经存在的色素受到破坏。在 TYMV 系统侵染的叶片中，所有 6 种光合色素浓度的降低程度相似。这是由于净合成（net synthesis）的停止，以及随后叶片的扩展而导致的色素稀释所致（Crosbie and Matthews，1974a）。

在显花叶症状的大白菜叶片的绿岛组织中色素浓度基本上是正常的（Crosbie and Matthews，1974a）。由于光线被遮盖，大型的白菜植株顶端（apex）的小叶（菜心）几乎不含叶绿素。当把这种约 2 cm 长的乳白色的叶子切下，暴露于光线，在 24 h 内，来自健康植株的叶片变成均一的暗绿色，而来自 TYMV 侵染的植株的叶片则形成明显的具有暗绿色岛和黄色区域的花叶图式。因此，在 TYMV 进行复制的幼嫩、扩展着的叶片组织中叶绿素合成受到了抑制。

并不是所有病毒均引起叶绿素的降低。CaMV Bari 1 株系侵染芜菁导致暗绿症状，而其他株系如 Cabb B-JI 则引起严重花叶和褪绿症状（Stratford and Covey，1988）。对叶绿素含量的分析表明，Bari 1 侵染的叶片叶绿素含量为（2.55±0.22）mg/g 鲜重（fresh weight），而 Cabb B-JI 侵染的叶片为（0.88±0.04）mg/g，未接种的健康对照为（2.12±0.32）mg/g。因此，Bari 1 株系侵染的植株中叶绿素含量为未接种的对照植株的 1.2 倍。

4. 花的色素

虽然对正常花色的遗传学和生化分析已做了很多工作，然而对许多病毒病的显著特征之一——花碎色（color-breaking）过程的生物化学机制还知之甚少。TMV 侵染烟草后，烟草正常的粉红色花瓣上可能出现白色条纹或区域。我们仅在白色区域中发现病毒。然而，病毒的存在与否并不是花碎色的唯一原因。在 BYMV 或 PEMV 侵染的香豌豆（*Lathrus odoratus*）中，淡粉红色的花有时有更深的粉红色和白色的区域。

病毒侵染似乎通常仅影响液泡中的色素——花色素苷（anthocyanin）。色质体（chromoplast）中的色素可能不会受到影响。例如，褐色的桂足香（*Cheiranthus cheiri*）含有花色素苷、花青苷（cyanin）和一种黄色的质体（plastid）色素，在 TuMV 侵染时变为黄色。利用层析法初步检测了被几种病毒侵染的变色花瓣和正常花瓣，发现颜色缺失是因为缺少特定的色素，而不是其他因素，如液泡中 pH 的变化所导致（Matthews，1991）。

Kruckelmann 和 Seyffert（1970）测验了 TuMV 侵染对紫罗兰（*Matthiola incana*）的几种基因型的影响。侵染既导致了白色条纹又使得色素加深。根据一套已知的寄主基因型的观察发现，病毒侵染仅仅影响控制色素生产量的基因的活性。看来对改变花色素

件结构的基因的活性没有影响。

L. 小结

在病毒侵染的植物中最普通的生理和生化变化是：①光合作用速率下降，通常与光合作用色素、叶绿体的核糖体以及 rbcs 的减少相关；②呼吸速率上升；③一些酶的活性提高，尤其是多酚氧化酶；④植物生长调节剂的活性降低或提高。

没有理由假设寄主植物代谢的紊乱是由病毒复制直接相关的主要过程导致的。病毒入侵和复制的一些次要、初始的影响可能导致寄主细胞深层次的次级变化。这种变化即使在侵染的早期阶段也可能使重要的初级影响变得不明显。

前面提到的寄主植物代谢方面的许多变化可能是病毒侵染的次要结果，并不是病毒复制所必需的。寄主植物的单基因变化或病毒的单位点变化可以使几乎没有症状的侵染变成严重的病害。类似的变化在细胞病原、机械或化学伤害引致的病害中发生。在许多病毒病害中，代谢变化的一般情况是类似于一个加速的老化过程。由于这些相似性，一定要谨慎使用依据病毒侵染的植物中化学成分改变的快速诊断方法。

第Ⅳ节　症状诱发涉及的过程

本节将讨论参与病害诱导的一些过程。现在我们还不能将病毒或寄主编码的特异性蛋白质与这些过程的起始联系起来。

A. 原材料的占据

在病毒引起病害症状的过程中，一个明显的机制是病毒利用寄主的原材料为病毒复制与表达服务而使得寄主细胞在某些方面缺乏本身所需的原材料。在寄主植物遭受营养胁迫时，这种机制更可能是一种致病因素。例如，轻微缺氮的大白菜受 TYMV 侵染后产生具有紫色晕圈的局部枯斑，紫色是缺氮的特征（Diener and Jenifer，1964）。环境条件也能引起特定的营养胁迫。例如，Ketellapper（1963）发现对植物生长不利的温度带来的不良影响能够通过给植物提供一些必要的代谢物而部分或完全补偿，而这些代谢物在正常温度条件下没有影响。这种影响在一定程度上是品种特异性的。不利的温度对植物生长的部分影响可能是因为缺乏特定的代谢物，而病毒侵染可以使这种缺乏状况加剧。

有时症状严重度的增加与增加的病毒产量相关。因此，Gillaspie 和 Bancroft（1965）在被菜豆荚斑驳病毒（BPMV）侵染的大豆中观察到突然发生的严重症状，随后是接种后 1.5 周和 4.5 周的恢复期。对叶片提取物的分析表明每单位组织的最高侵染性发生在症状突发期开始时。随后侵染性降低，但是在第二个症状突发期侵染性又上升。然而，在健壮的植物中，产生的病毒数量和病害严重度之间没有联系（Palomar and Brakke，1976）。同样地，在宏观病害严重度和病毒侵染导致的多种生理和生化变化之间也不一定有相关性（Ziemiecki and Wood，1976），尽管已经发现了一些这种相关性。

利用 TMV 26 个不同的株系来侵染烟草和番茄，Fraser 等（1986）通过多元回归

分析发现病毒增殖和症状严重度的变化能够说明大部分烟草生长的变化。但是番茄不属于这种情况。而且，就这种实验的本质来说并不能证明因果关系。

除了在上面指出的已存在的特定营养胁迫条件外，病毒将氨基酸和其他物质装配进病毒粒体与症状产生没有直接联系。下面的事实支持这一观点：

（1）病毒是由大致与细胞蛋白质和核酸相同比例的材料组成的。即使在发病组织中浓度相对高的病毒，如 TMV 和 TYMV（>1.0 mg/g 叶片鲜重），形成的病毒数量相对于侵染引起的其他大分子的减少是很少的。TYMV 侵染大白菜植株后，减少的正常蛋白质和核糖体量是产生的病毒量的 20 倍（Crosbie and Matthews，1974b）。

（2）同一病毒的相近株系在特定寄主中能达到相同的病毒浓度，但对寄主细胞成分的影响明显不同。

（3）TMV 的代表株系侵染白肋烟时，在 35℃产生褪绿斑，但在 20℃时不产生。而 35℃时产生的病毒量大约是 20℃时的 1/10（Kassanis and Bastow，1971b）。

（4）烟草植株的一个单一基因变化就能导致 TMV 产生的典型花叶病变成过敏性坏死反应。TMV 在侵染这两种基因型植株的 F_1 代杂交植株是产生致死性系统性坏死，但病毒产量明显降低。

（5）CMV 侵染西葫芦子叶时引起的代谢变化不能直接与正常代谢产生的碳向病毒组分的合成分流相联系（Técsi *et al.*，1994）。

前面的论述中已经考虑到组织提取物中病毒的数量。然而，在单个细胞中病毒复制速率是影响细胞事件发展的一个重要因子。在病毒复制中对关键氨基酸或其他物质的需求非常高的时期很短，或许几个小时就能够对细胞产生不可逆转的主要的长期影响，随后是对组织和器官的影响。另外一个需要考虑的可能性是，在 PSbMV 侵染豌豆子叶的前沿处关闭寄主基因是一个普通的现象，这使得在寄主细胞的重要时刻关键蛋白质的耗竭（depletion）。然而，对这种影响还没有确定的、来自单个细胞水平的证据。

B. 对生长的影响

1. 矮化

病毒侵染引起生长矮化的生化机制有 3 种：生长激素活性的变化、可利用的碳固定产物减少以及营养吸收的减少。

a. 生长激素的变化

很少有人怀疑病毒引起的激素浓度的改变是病毒侵染导致矮化的因素之一。

应该记住的是，化学和生物学上对控制生长试验中的植物激素的定义是基于离体组织或器官的情况。但是，在整个植株上，每组激素引起许多生长和生理上的影响。它们的功能在一定程度上是重叠的，它们之间的相互作用是复杂的。在一个特定的过程中，它们的影响可能是相似的、相互作用的，还可能是相互对抗的。在植株中，所有或大多数激素均参与所有的特异性发育过程。病毒侵染通过在不同生长阶段不同器官各种激素的合成、转运、效力的增加或减少而影响植物生长的途径可能有许多。因此，我们所了解的病毒和激素之间的相互作用是非常粗略的。

在大多数情况下，病毒侵染降低了生长素和赤霉素的浓度而提高了脱落酸的浓度。

乙烯的产生受到病毒引起的坏死及局部褪绿斑发展的刺激，但在病毒系统移动而没有发生坏死的地方不会受到刺激。报道的病毒侵染对细胞分裂素的影响是不一致的（Fraser and Whenham，1982；Whenham，1989）。下面将讨论病毒与激素相互作用研究方面的3个例子。

CMV侵染黄瓜子叶时增强了乙烯的产生，这种增加在下胚轴延伸速率下降前开始（Marco *et al.*，1976）。人为减少乙烯含量可促进受侵染幼苗的伸长，但不如对健康幼苗伸长的影响大，表明这个过程有其他一些因子的参与。进一步的研究发现抑制下胚轴延伸的过程中伴随着赤霉素类物质的减少和脱落酸的增加（Aharoni *et al.*，1977）。这一研究阐明了病毒侵染对激素平衡影响的复杂性以及建立因果关系的难度。

Whenham等（1985）发现，烟草受TMV侵染时叶绿体外的脱落酸的浓度提高，而对叶绿体内的激素量几乎没有影响。脱落酸浓度的提高与TMV的6个株系病害严重度的增加呈正相关。然而，TMV侵染番茄却未提高脱落酸的浓度（Fraser and Whenham，1989）。

Fraser和Matthews发现，TYMV接种白菜小幼苗的子叶后，苗端叶片起始（initiation）过程发生迅速的瞬间抑制，这是在病毒移动出接种叶之前很长时间就发生的。通过在子叶上施用一个剂量的脱落酸能引起这种影响的事实支持了这种影响可能是由于脱落酸引起的观点。在10^{-5}～3×10^{-3}mol/L的浓度范围内，这种影响的程度不依赖于酸的浓度（Fraser and Matthews，1983）。支持脱落酸参与这种影响的进一步证据来自下面的实验。将刚接过种的大白菜叶片的叶柄放在水中，自切口扩散出的一种物质能够模拟病毒接种对叶片起始的快速影响。加入赤霉素（浓度为10^{-4}mol/L的GA3）（Fraser *et al.*，1984）就能够抵消这种渗出液的影响。因此，病毒接种很可能引起了苗端脱落酸和赤霉酸GA3平衡的迅速改变。

b. 可用的固定碳的减少

除了对激素平衡的影响外，如果在光合作用中碳的固定受到限制，植物也将变矮化（至少在干重上）。有几种途径能够导致可用的固定碳的减少。

i. 对光合作用机构（apparatus）的直接影响

这方面最明显、也可能最普遍的是病毒侵染缩小了植物的尺寸。

在每株植物基础上，TYMV侵染大白菜后3种主要的叶绿体组分，叶绿素a、Rubisco、68S核糖体以相同的程度减少（Crosbie and Matthews，1974b）。这些变化在大多数病毒复制完成后就发生，前两个组分的减少发生在核糖体受影响前。

在寄主-病毒相互作用中导致叶绿体中碳固定减少的最初事件还不清楚。激素可能在起始叶绿素降解中起作用。BYMV接种番杏（*Tetragona expansa*）叶片时产生局部褪绿斑。褪绿斑出现后不久，从叶片释放出的乙烯显著增加（Gáborjányi *et al.*，1971）。Marco和Levy（1979）发现CMV侵染黄瓜子叶后，在局部斑处产生了乙烯。通过通风去除乙烯能够延缓局部褪绿斑的出现。

ii. 叶绿体中淀粉的积累

在病毒侵染中通常见到的叶绿体中淀粉的积累一定是来源于植物正在生长的部分新固定的一些碳。这种积累可能是因为叶绿体膜的渗透性降低或者是由于叶绿体中酶活性的变化。

iii. 气孔开放

病毒侵染导致甜菜黄化后，叶片光合作用降低部分是因为病毒侵染引起气孔开放的减少（Hall and Loomis，1972）。气孔对光照强度变化的反应降低可能是白天较早时段在 TYMV 侵染的叶片中限制碳固定的一个因子。

iv. 固定碳的转运

病毒侵染的所有影响如引起韧皮组织效率下降的坏死必定限制固定的碳自成熟叶片转运到生长的组织中。但是，叶片细胞渗透性的降低对于向韧皮部输送糖可能是一个更普遍的限制因子。

v. 叶片的姿态

叶片姿态可以影响大田中光合作用的总效率。例如，具有竖立叶片的小麦品种比叶片松弛型的品种固定更多的 CO_2（Austin *et al.*，1976）。病毒侵染能够影响植物的生长习性，但还没有这一因素与每株植物中碳固定关系的研究。

c. 叶片起始的降低

在病毒侵染后矮化的草本植物中，叶片数目的减少是一个微不足道的因素。例如，在接种后 100 天，TMV 侵染的烟草植株比健康植株只少一片叶（Takahashi，1972b）。对 TYMV 接种的非常幼嫩的大白菜的叶片起始的仔细分析发现叶片起始速率瞬时迅速降低，在 1～2 天中比对照植物降低了 1/4～1/3。随后起始速率又恢复了。在后来的生长期中，病毒侵染的植株大概比健康植株少一个叶片（Fraser and Matthews，1981）。TuMV 和 CaMV 在大白菜上产生同样的影响。因此，这种影响可能是普遍的。

d. 营养吸收的降低

极少有实验性研究针对病毒侵染对根系自土壤中吸收矿物质营养并转运到植物其他部分的影响。但是，对氮的固定可能有不利影响。在第 3 章（第Ⅱ节 B. 10）中论述了结瘤（nodulation）的减少。TRSV 可以削弱大豆的生长，至少部分原因是由于在生长的早期抑制豆血红蛋白（leghemoglobin）的合成和固氮（Orellana *et al.*，1978）。SMV、BPMV 分别或同时侵染大豆时减少了根瘤菌引起的结瘤。当在植株生长的早期接种病毒时，结瘤减少最严重（大约减少 80%）（Tu *et al.*，1970）。在根瘤菌侵染大豆根系细胞的第一个阶段（即侵染阈值的发展和根瘤菌释放到细胞质中）不受 SMV 的侵染影响（Tu，1973）。在根瘤菌侵染的第二个阶段，在细菌细胞周围形成的一个包膜形成了一个类菌体（bacteroid）。在病毒侵染的根系中观察到了一些结构上的变化如包膜囊泡化（vesiculation）的减少（Tu，1977）。同样地，BCMV 和 BYMV 侵染导致菜豆（*P. vulgaris*）结瘤的减少，同时伴随症状严重度增加（Tu，1997）。在另一方面，BRMV 侵染菜豆、CMV 侵染紫花苜蓿（*Medicago truncatula*）和狭叶羽扇豆（*Lupinus angustifolius*），以及 AMV 侵染南苜蓿（*M. polymorpha*）不影响根瘤（nodule）的数目但是减少了根瘤的生物质（biomass）（Izaguirremayoral *et al.*，1994；Wahyuni and Randles，1993；Wroth *et al.*，1993）。对于种传病毒 AMV 侵染南苜蓿时，根瘤生物质减少了 23%，导致了根系干重减少了 21%以及出芽 53 天后固定的氮减少了 24%（Wroth *et al.*，1993）。长根瘤的紫花苜蓿和狭叶羽扇豆对 CMV 的感病性要低于未长根瘤的植物；但是，未长根瘤的植物在施加氮后比没有附加氮的植物感病性更高（Wahani and Randles，1993）。

e. 对整株植物的生长分析

对发生花叶病的草本植物的矮化过程进行分析是一个极端复杂的问题，我们对这一点还没有充分的研究。最开始研究的是 TYMV 的一个“白色”（white）株系侵染的大白菜。这一株系在病害组织中引起非常明显的叶绿素含量的减少（Crosbie and Matthews，1974b）。

在研究期间，健康植物生长处于一个大概的对数期（以每株植物中叶绿素的数量计算）。病毒侵染导致叶绿素 a 在数周内持续减少。患病植物在这一时期的生长几乎是线性的。推测这是因为在几周内叶绿素成分增长得非常少。

感病的植物通过两种方式对叶绿素的减少做出反应：①可供生长所用的更高比例的物质用于形成叶片，而不是中脉（midrib）、叶柄、茎或根系；②在后来形成的叶片中有更高比例的暗绿组织，因此这些绿岛中的叶绿素在总数中占很大的比例。

这些试验中用到的 TYMV“白色”株系比“淡绿”（pale green）株系引起眼睛可观察到的严重得多的病害。最近的分析表明这两种株系侵染的植物的根系和地上部分的总鲜重差别不大。总差别主要是因为：①植株中总叶绿素的不同分布；②强株系侵染引起的生长形式更剧烈的改变（如茎、叶柄、中脉的减少）。Takahashi（1972a，b）研究了 TMV 侵染对烟草叶片大小和性状以及节间长度的影响，但是他没有把这些影响与叶绿素损失做相关性分析。

2. 偏上性（epinasty）和叶片脱离（leaf abscission）

Ross 和 Williamson（1951）的实验表明酸浆（*Physalis floridiana*）被 PVY 侵染后引起的偏上性生长反应和叶离现象与一种生理活性气体的产生有关，这种气体可能是乙烯。

CMV 接种黄瓜子叶 48 h 后，乙烯的散发与对照比开始降低（Levy and Marco，1976）。在同一时期里，叶片内部的乙烯浓度上升，病毒侵染引起子叶明显的偏上性生长反应。下面的证据有力地证明了偏上性生长是由于乙烯浓度增加的缘故：

（1）在偏上性生长反应开始前乙烯浓度达到峰值。

（2）乙烯处理健康黄瓜引起偏上性生长。

（3）通过低气压通风促进叶片内部乙烯的清除而能够阻止侵染的子叶的偏上性生长。

这些是证明激素直接参与病毒侵染引起症状产生的最好证据。还不清楚的问题是病毒侵染如何刺激乙烯产生以及激素如何产生影响。

3. 异常生长

a. 病毒引起的肿瘤

呼肠病毒科（*Reoviridae*）所有植物病毒成员（除 RDV 外）均在寄主植物上引起肿瘤（参见第 3 章第Ⅲ节 C），但在病毒也可进行增殖的昆虫介体中不引起肿瘤。

不同的病毒有特定的器官或组织特异性。例如，WTV 侵染引起的肿瘤主要集中在根部，少量在茎部。FDV 在茎和叶片的脉上引起肿瘤性生长（neoplastic growth）。因此，我们能相当确定病毒基因组有诱导引起肿瘤形成的功能，但我们对这些功能如何产

生还很不清楚。在WTV引起的肿瘤中，伤害发挥了作为诱导因子或启动子的重要作用。伤害释放的激素可能在这一过程中发挥了一定作用。在WTV侵染的甜苜蓿的茎端有初始的微肿瘤（microscopic tumor initial），这些微肿瘤通常不发育成大的肿瘤。施用吲哚乙酸（IAA）时就刺激了这些肿瘤生长成肉眼可见大小的肿瘤（Black，1972）。

一些病毒，如PEMV和曲顶病毒属成员（curtoviruses）在叶片上引起耳突（参见第3章第Ⅱ节B.7）。目前对耳突产生的过程还知之甚少。

b. 组织畸形

在表现花叶症的叶片上，绿岛组织经常呈现凸起或畸形。这引起了周围组织细胞缩小，以致整个叶片都缩小。在绿岛组织中的细胞所受到的影响要小得多，并且在叶片的平面没有伸展的空间。因此叶片出现突起或凹陷而适应这种伸展。病毒侵染对叶形的其他影响已在第3章（第Ⅱ节B）中讨论过。

C. 对叶绿体的影响

1. 局部褪绿斑

Marco和Levy（1979）已证明黄瓜子叶在接种CMV后产生的局部褪绿斑可能是由于病毒侵染引起的内源性乙烯释放而引起的。他们发现在局部枯斑出现前几个小时乙烯生产量大幅升高。而且，施用乙烯引起叶片黄化，但抑制乙烯产生时延缓了枯斑的出现。

2. 结构变化

TYMV侵染大白菜为研究病毒引起的叶绿体结构变化提供了特别有用的材料。这是因为在大量细胞中，病毒引起的叶绿体积聚与一些其他变化如大型小泡的形成（镰变，sickling）和断裂能够用光学显微镜来观察。

例如，在镰变过程中，在病毒侵染的原生质体的叶绿体中出现大量的清晰的小泡，含有叶绿素的结构被限制在叶绿体的一个新月形（镰形）部分中。这些小泡被局限在基质片层（stroma lamellae）中出现的膜上（Fraser and Matthews，1979b）。在镰变的过程中，红光和蓝光是同样有效的诱导因子，而在黑暗中不发生该过程（Matthews and Sarkar，1976）。在接种叶片6～8天后，尽管叶片吸收的光强度高于在分离的原生质体中引起镰变的适当光强度，但在新分离的原生质体中很少表现出镰变。因此，在完好的叶片中有一些因子部分抑制镰变过程。

D. 花叶症状

在第3章（第Ⅱ节B.2）中已描述了花叶图式。只有在病毒经过长距离移动后扩散到库叶中才出现花叶症状。我们在此将讨论参与花叶症状的各种因子。在第10章第Ⅵ节中，将讨论诱导花叶症状形成过程中病毒分子生物学的知识以及现有的关于症状如何发展的观点。

1. 病毒株系的作用以及花叶病的绿岛组织

在一些病毒性侵染中，如TMV侵染烟草时，单个植株的病害很大程度上似乎是由

病毒的单一株系引起的。但是，很多年前就已经知道在花叶症状中出现的明黄色组织中含有病毒的不同株系。这些株系可能通过突变产生，并在叶片发育中开始在一块组织中排斥最初的温和型株系。在 TYMV 侵染的大白菜中，有许多颜色稍有差异的组织，从这些组织中已分离出不同的株系（Chalcroft and Matthews，1967a，b）。

绿岛组织通常在这两种病害以及许多其他花叶病害中存在。绿岛组织是花叶的主要组成部分，并且对于发病植株的生长起重要作用。

2. 花叶症状的结构

a. 病毒侵染时的叶龄

在植物生长的各个时期接种病毒，已经发现 TYMV（Chalcroft and Matthews，1966）和 TMV（Atkinson and Matthews，1970；Takahashi，1971）在叶片特定位置产生的花叶类型不依赖于接种的位置，而是依赖于病毒接种时叶片所处的发育阶段。有一个叶片大小的临界值，此时接种病毒不引起花叶症状。就 TMV 侵染烟草叶片而言，这个临界叶片长度约为 1.5 cm（Atkinson and Matthews，1970；Gianinazzi *et al.*，1977）。非洲木薯花叶病的症状在叶片发育早期就确定了，随后变化很小（Fargette *et al.*，1987）。

b. 岛状组织大小的梯度

尽管花叶症状中肉眼可见的（宏观的）岛状组织的大小是不同的，但在植株中倾向于存在一定的梯度。在受到系统侵染时较幼嫩的叶片上花叶症状由较大的岛状组织构成。即使在一个叶片中，在岛状组织数目和大小与细胞分裂频率所决定的叶片不同部分的生理龄期之间也可能有一定的关系。

c. 在非常幼嫩的叶片中病毒的存在以及花叶图式

一些病毒能够侵入顶端区域（参见第Ⅱ节Ⅰ.8 部分）。但是，在受 TYMV 侵染、尚未形成大量叶绿素的非常小的白菜叶片中已经有花叶症状（Matthews，1973）。

d. 宏观花叶症状的图式

宏观的花叶症状的图式（pattern）通常是非常混乱的，由此不能推断出其个体发育的起源（ontogenic origin）。在顶端原始细胞（apical initial）中已经可以偶尔观察到了清晰的图式。例如，已经观察到在大白菜叶片（或连续几个叶片中）的主脉处存在两个岛状组织：一个是绿岛组织，另一个是受到病毒均一侵染的组织（Matthews，1973）。这些观测结果表明单个顶端原始细胞可能已经受到病毒或可诱发产生深绿组织的其他病原的侵染。

e. 微观花叶

总体上看，花叶图式是由微观花叶组成的。在 TYMV 侵染的大白菜叶片中微观花叶症状仅仅在接种时长度小于 1～22 mm 的叶片中发展。在这样的叶片中，肉眼看起来颜色一致的花叶图式中的一些区域在微观检验中可以发现是由不同水平层的具有不同叶绿体类型的叶肉细胞构成的混合组织。可以发现各种各样的混合组织。例如，在一些区域，栅栏组织和海绵组织的下层由暗绿色组织构成，而叶片中间区域的细胞呈白色或黄绿色［图 9.27（A）］。这种情况是可以逆转的，即中间层为暗绿色，而上、下层由褪绿的细胞组成［图 9.27（B）］。

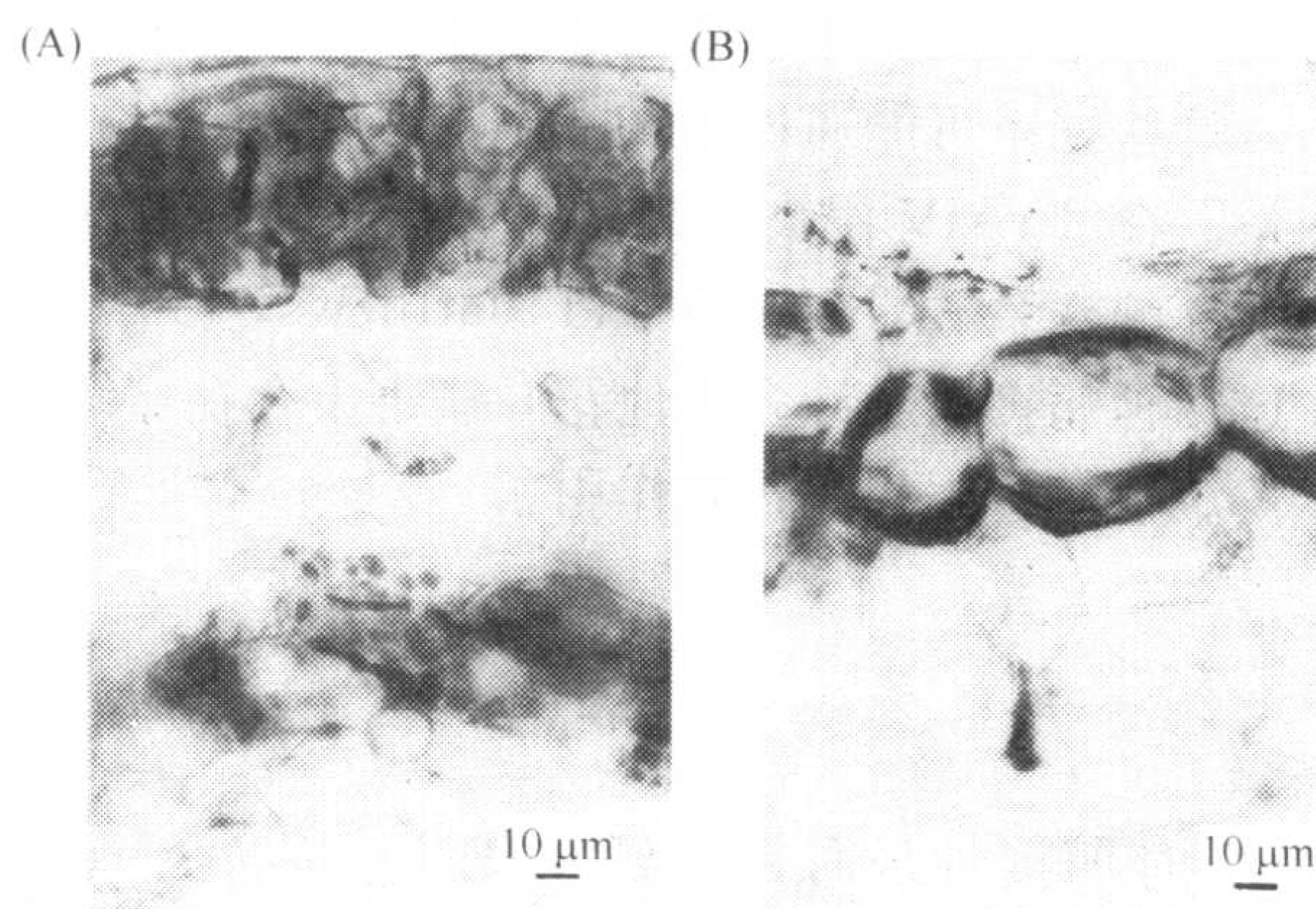


图9.27 TYMV侵染的大白菜叶片中微观花叶的分层。(A)上部和下部细胞层(LII)为暗绿色区域;中央区域(LIII)为白色;(B)为图(A)的反相。经允许,引自 Chalcroft 和 Matthews (1967b)。

在新鲜叶片切片中可以看到,这些水平层区域可能长达几毫米,或者相当小,小至几个细胞形成的岛甚至是一个不同类型的细胞。在微观花叶症状中,暗绿色细胞和不正常细胞岛状组织的连接处的界限通常是非常明显的。

上述的不同颜色细胞层的排列方式并不限于暗绿色细胞层与病毒侵染的褪绿细胞层。微观花叶也包括对叶绿体具有不同影响的病毒的不同株系侵染的细胞层。

3. 花叶的遗传控制

尽管 TYMV 侵染芸薹属(*Brassica*)植物最突出的影响是在叶绿体上,但该细胞器对侵染的反应在一定程度上是受细胞核控制的。芜菁(*Brassica rapa*)的几个品种对所有分离自大白菜(*B. pekinensis*)的 TYMV 株系均产生轻度弥漫性斑驳。在将芜菁与青菜(*B. chinensis*)杂交后,所有后代对这些株系均产生与青菜相同的反应(Matthews,1973)。

4. 暗绿组织的性质

已检测的花叶症状中的绿岛组织,在细胞学和生物化学上是正常的。它们含有少量的侵染性病毒甚至没有病毒,检测不到病毒蛋白和病毒的复制型 dsRNA。在 WMV 侵染引起花叶病的南瓜叶片中,在花叶的暗绿色区域没有或者仅有少量柱状内含体和无定形内含体蛋白质以及病毒外壳蛋白(Suzuki *et al.*,1989)。

有多种证据表明绿岛组织对同一病毒或相近病毒的重复侵染具有抗性(Chalcroft and Matthews,1967a,b;Atkinson and Matthews,1970;Loebenstein *et al.*,1977)。

有多种因素能影响花叶的绿岛组织在叶片组织中的比例。这些因素包括叶龄、病毒株系、季节以及植株的下部叶片的去除(Crosbie and Matthews,1974b)。绿岛组织可能并不是在叶片中一直都处于无病毒状态。通常几周后或者温度突然升高后就发生病毒复制,导致绿岛组织崩溃(Atkinson and Matthews,1970;Matthews,1973;Loebenstein *et al.*,1977)。

已经提出多种理论来解释绿岛组织的性质。绿岛组织的确不是仅仅由避开侵染的组织所组成的。还没有证据表明绿岛组织中有病毒弱株系的存在。可能是绿岛组织中的细胞被缺损型株系占领，但这样的株系不产生或产生很少完整的病毒或病毒抗原，并且在不产生可检测的细胞学影响的情况下复制。目前还不能排除这些情况的发生，但另一方面，尚没有证据证明它们的存在。

Gera 和 Loebenstein（1988）从 CMV 侵染的烟草叶片绿岛组织中分离了一个抑制病毒复制的抑制剂。然而，他们没有在含有病毒的黄色组织中检验是否有抑制子的存在。暗绿组织中的这种抑制子的作用还有待于确定。当 TMV 侵染表达 30 kDa 移动蛋白的转基因烟草植株时，产生的花叶病在所有方面都表现正常。因此，我们可以推断 30 kDa 蛋白质不参与绿岛组织的形成和保持。

E. 膜的作用

典型的叶片细胞是高度区室化的（compartmentalized），并且人们日益清楚膜在正常细胞行使功能中的关键作用。在受侵染的细胞中，病毒复制涉及诱发产生新的或改变的膜系统（参见第 8 章）。已经知道动物病毒和细菌病毒可改变寄主细胞膜的结构和渗透性。植物病毒侵染昆虫介体细胞时可以改变质膜的物理特性（Hsu，1978）。

病毒引起的多种反应（前面几部分已经讨论了一些），表明膜功能变化的方式可能对植物有深远的影响。例如，

（1）病毒侵染可以影响气孔开放。光合作用网络可能因为气孔开放而受到限制，而气孔开放反过来依赖于保卫细胞膜的功能。

（2）Levy 和 Marco（1976）的工作证明了病毒引起的气孔关闭导致的一种不同后果。病毒诱发的气孔抗性导致内部乙烯浓度提高进而引起偏上性反应（epinastic response）。气孔开放的变化可能是由保卫细胞质膜特性的变化而引起的。

（3）受侵染叶片中蔗糖的积累似乎是依赖于膜渗透性的变化而不是韧皮部功能的变化。

（4）病毒引起的叶绿体中的淀粉积累可能至少部分是由于叶绿体膜渗透性的改变。

（5）乙烯参与病毒病一些症状的形成是毫无疑问的。已经发现乙烯可引起［1-^{14}C］丙三醇掺入到豌豆茎磷脂速率的迅速降低（Irvine and Osborne，1973）。

（6）活细胞在质膜内外存在着电化学势差，其内部为电负性的。在膜的电化学势差和跨膜的离子转运是相互依赖的。Stack 和 Tattar（1978）发现 TRSV 侵染豇豆（*Vigna sinensis*）改变了其跨膜电势。

因此，有关病毒改变膜特性方式的更加详细的知识是我们充分理解病害发生的前提条件。

第Ⅴ节　讨论

在过去的 10 年中，对理解病毒如何在植株中移动，如何在细胞间以及自接种叶移动到植株其他部分已经有了主要进展。同时这些研究已经激发了对大分子在植株内移动的更详细的研究。

如第Ⅱ节 D.5 部分所述，针对病毒通过胞间连丝的细胞间移动已经提出了 5 种策略。但是，近来的研究结果模糊了至少两种策略的差异界限。AMV 移动蛋白具有与 TMV 和“30K 超家族”移动蛋白类似的一些共同特性，但前者形成暂时的穿过胞间连丝的细管。关于病毒在细胞间移动还有许多问题要回答，它们包括：

（1）在侵染前沿，移动蛋白如何打开胞间连丝？

（2）移动蛋白自身是否与胞间连丝蛋白或其他大分子相互作用，或者参与导致 SEL 增加的一系列事件的起始？

（3）通过胞间连丝的侵染单位的形式是什么，什么力量使得病毒从侵染细胞移动到未受侵染的细胞？

（4）在侵染单位通过胞间连丝后，胞间连丝如何关闭并恢复正常的信号控制状态？

（5）病毒是通过已经存在的胞间连丝还是通过新形成的胞间连丝？如果它们通过已经存在的胞间连丝，是否存在一些易于打开的胞间连丝？

（6）决定组织特异性以及共质体域的胞间连丝的特征是什么？

还有许多要回答的问题有关病毒长距离运输的细节，它们包括：

（1）病毒自韧皮部薄壁细胞移动到筛分子的确切途径是什么？对单一病毒或一组病毒而言是否有特异性的不同途径？倘若如此，是什么因素决定了其独特的途径？

（2）自源叶到库叶的筛分子途径是什么？在第Ⅱ节 G.3 部分中已指出，有些证据表明发生了自源叶的外部韧皮部到通向库叶的内部韧皮部的转换。在各种植物中进行系统移动的所有病毒是否均发生这种转换呢？

（3）侵染单位被转运的形式是什么？许多病毒进行长距离移动需要外壳蛋白（参见第Ⅱ节 G.5），但是它们形成病毒粒体吗？如果看到了病毒粒体，它们是卸出的形式吗？

（4）何种因素导致侵染单位从筛分子的卸出？

最后的两个问题难于回答，因为卸出和建立系统侵染的侵染单位可能仅是一种次要形式（minority form）。而且，对特定病毒而言，在不同条件下所倾向采取的卸出（和装入）形式可能有所不同。

尽管已经进行了多年的研究工作，但人们对各种症状产生的详细生化过程还知之甚少。现有的大多数信息还只是描述性的。现在随着新技术和方法的应用，对产生症状的生化机制的解析将是一个非常有意义的研究领域。像对病毒移动的研究一样，对病毒状况的了解将有助于我们对未侵染情况的了解。对导致症状产生的生化途径紊乱的研究将增进人们对非侵染情况下这些途径的调控细节的了解。

第 10 章　病害的诱发Ⅱ：病毒与植物的相互作用

第Ⅰ节　概述

在前面的章节中已经总结了有关病毒复制、宏观和微观症状以及与复制相关的生理学和生物化学的知识现状。过去 10 年中，对病毒和植物之间的分子（相）互作（用）方面的理解已经有一些主要进展，本章将对其加以综述。我们最终希望以分子生物学和生物化学术语解释，一个只包含编码几个多肽的遗传物质的病毒粒体如何能够侵染其寄主植物并且引起病害。这是一项艰巨的任务，因为寄主植物在不断地生长并且形成具有特定的结构和功能的各种组织和器官（Goldberg，1988）。

目前我们对任何寄主/病毒组合的了解远未达到这一终极目标。然而，应用基于重组 DNA 技术的方法研究病毒基因产物在病害诱导中的作用为我们提供着有关植物受到病毒系统侵染时所引发的植物与病毒间相互作用的日益增多的信息。目前常用的重要技术手段包括病毒侵染性克隆（infectious clone）的构建、病毒基因组的定点诱变（site-directed mutagenesis）、不同病毒和病毒株系之间基因的交换、只表达一个或几个病毒基因的转基因植物的构建以及寄主植物尤其是拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）基因的分离与序列测定（sequencing）等。应用这些技术手段使我们了解到病毒基因诱导病害和植物对其反映方面的新信息，但是，正如下列各节将要讨论的，它们也有其自身的局限性。

更重要的是我们对于病毒基因组和寄主基因组之间在互作的概念上的新进展。从本质上讲，寄主总是试图限制病毒侵染，而病毒则一直企图克服这些限制。鉴于这些新的概念，我们必须重新调整以前的一些观念。在本章中，我们将讨论目前已知的在两个基因组之间互作的情况以及能影响这一互作结果的各种因素。

第Ⅱ节　寄主对接种反应的有关定义及术语

“寄主”这个术语已在第 3 章（第Ⅴ节）加以定义，但是描述接种病毒后植物表现的各种反应的术语使用尚不够严谨，并且有时不一致。因此，多年以来，对某些术语含义的理解与运用相当混乱。Cooper 和 Jones（1983）讨论了这一个问题，并且提出了标准化的用法。尤其是他们引入了术语“infectible”（可侵染的）作为“immune”（免疫）的反义词。

Matthews（1991）鉴于当时的知识，并在采纳了 Cooper 和 Jones 的建议（1983）后，在本书（*Plant Virology*）第 3 版定义了有关的术语（表 10.1）。其中一些术语的使用与病毒学的其他分支不同。例如，用于细菌病毒或脊椎动物病毒的词“latent”（潜隐的）通常指病毒的基因组被整合进入寄主基因组之内。只是在近年才了解到，少数植

物病毒亦可整合进寄主基因组内，并且整合体（integrant）被激活后产生游离型侵染（episomal infection）（参见第 8 章第Ⅸ节 B. 4）。因此，鉴于这些研究发现，我们可能必须重新审议“latent”这个术语。

表 10.1　植物对病毒接种的反应类型

免疫(非寄主)：病毒在原生质体中不能复制，在完整的植物细胞（即使是在最初接种的细胞）中也不能复制。接种物病毒可以脱壳，但不产生子代病毒基因组
可侵染的（寄主)：病毒可以侵染原生质体，并在其中复制
抗病(极端过敏性反应)：由于病毒编码的移动蛋白无效，病毒增殖限制于最初侵染的细胞中，导致阈下侵染；植物为田间抗病型（field resistant）
抗病(过敏性反应)：由于寄主的反应，侵染被局限于最初侵染细胞周围的细胞带中，通常形成可见的局部坏死斑；植物为田间抗病型
感病（susceptible）（系统移动与复制）
敏感（sensitive)：植物反应表现为程度不同的严重病害
耐病（tolerant)：对植物的影响很小，导致潜隐性（latent）侵染

许多年来一直认为，病毒与寄主细胞的互作一定涉及寄主和病毒的大分子之间存在的特异性识别或缺乏识别。互作可能包括病毒核酸的活性，或病毒编码的特异性蛋白质，或因病毒的侵染而诱发或抑制的寄主蛋白质。病毒侵染对寄主蛋白质的影响已在第 9 章（参见第Ⅲ节 B. 3 部分）讨论过。对涉及病害诱发的互作逐渐增加的理解来自于对各种不同形式的病毒抗性的研究和对这些现象与寄主在受其他的微生物和有害生物（pest）攻击时的反应相似性的认识。

抗性基因（*R* gene）

Flor（1971）在关于亚麻（*Linum usitatissimum*）对亚麻锈病病原（*Melampsora lini*）的抗性遗传方面的研究中，提出了经典的“基因对基因”（gene-for-gene）模型即抗性的产生需要一对（一个在寄主中，另一个在病原中）互补的显性基因。寄主抗病（*R*）基因或病原无致病力（无毒，avirulence）基因（*Avr*）的缺失或改变会导致病害，即亲和性反应（compatibility）（图 10.1）。在最近几年，我们对抗病基因（*R*）和无毒基因（*Avr*）之间的互作的理解逐渐增加。一般情况下，这种互作将导致局部和系统性的信号级联（signal cascade）。局部的信号级联激发的寄主反应将病原侵染控制在初始位点，系统性级联启动植物其他部位的防卫系统。

寄主表型（基因型）	病原基因型		
	无毒（AA）	无毒（Aa）	致病（aa）
感病（rr）	+	+	+
抗病（Rr）	–	–	+
抗病（RR）	–	–	+

图 10.1　Flor（1971）的基因对基因假说。寄主对病原的反应：+，感病；–，抗病。

在过去的10年中，众多的植物抗病基因已被鉴定、克隆及测序（见综述 Hammond-Kosack and Jones，1997；Richter and Ronald，2000）。其中许多具有明显的结构相似性，现在基于其结构分为5个组群（图10.2）。许多抗病基因产物含有一个富亮氨酸区域（leucine-rich region，LRR）和一个核苷酸结合部位（nucleotide-binding site，NBS）。其他的共同特征包括一个丝氨酸/苏氨酸激酶域、一条亮氨酸拉链（leucine zipper，LZ）或昆虫中的相应基因（果蝇的发育基因 *Toll*）和哺乳动物的免疫反应基因 *TIR* 的结构（Baker *et al.*，1997）。这些基因的详细结构的进化使寄主产生了新的抗性专化性（见综述 Richter and Ronald，2000）。

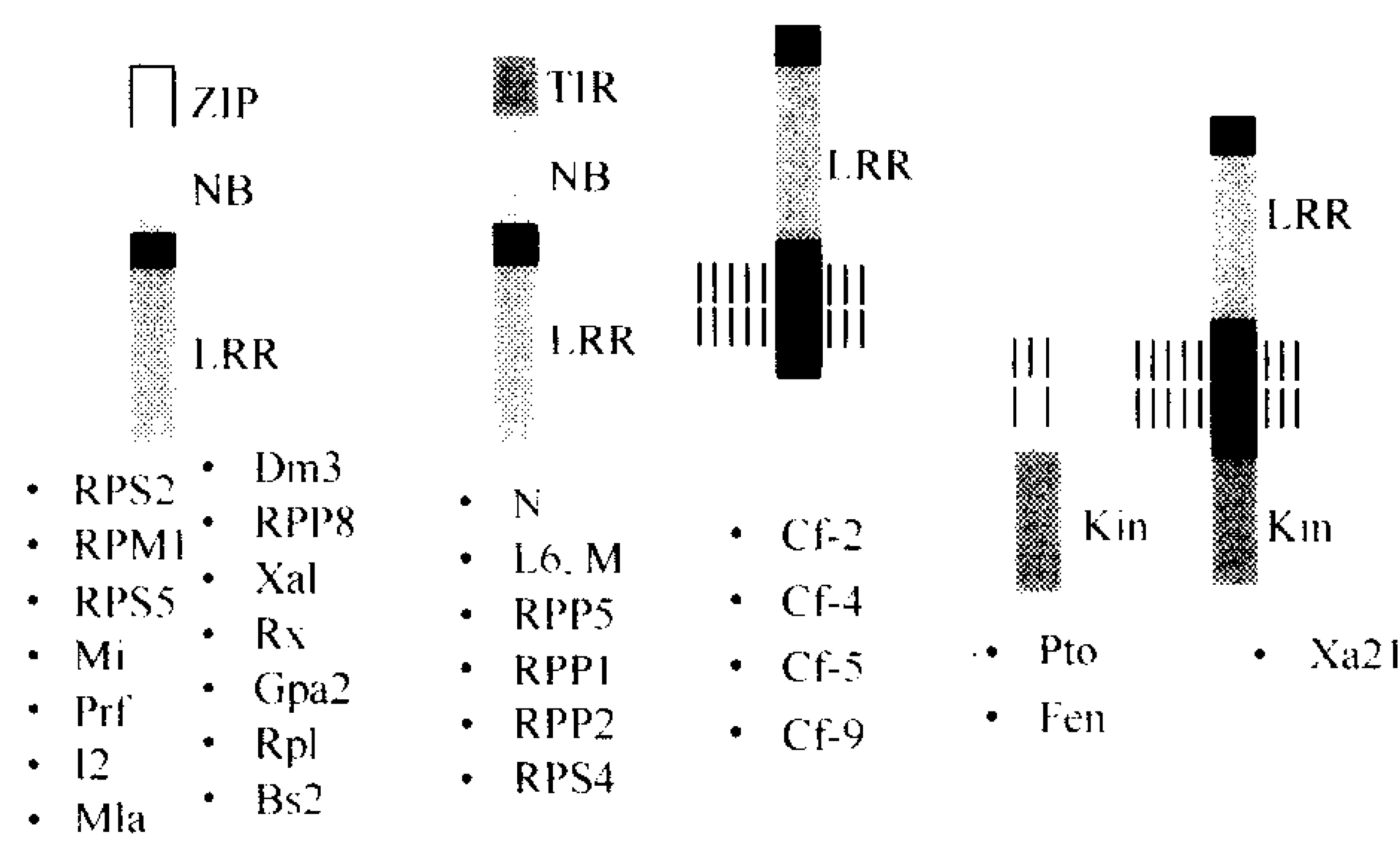


图10.2 （见彩色图版10.1）5类 *R*（抗病）基因的结构。LRR，富亮氨酸重复区；NB，核酸结合域；ZIP，亮氨酸拉链域。每个结构图下部列出了已知属于该类别的基因。

植物 *R* 基因看来编码某些受体，与病原 *Avr* 基因产生的激发子（elicitor）直接或间接地互作。LRR很可能是病原识别域（Parker *et al.*，2000）。如上所述，这一识别会激发信号转导级联，其确切机制尚不清楚，但是可能包括水杨酸（salicylic acid）、茉莉酸（jasmonic acid）和乙烯（Yang *et al.*，1997；Innes，1998；Parker *et al.*，2000）。

第Ⅲ节　病害诱发的步骤

各种证据显示病毒的基因一定以相当专化的方式参与病害的诱发（induction）。例如，TYMV的一些密切相关的株系在TYMV侵染的细胞的叶绿体中产生两个不同且相互排斥的变化途径。在一个途径中，叶绿体首先变圆而且成团（clumped），然后发展成一个大的液泡；在另一个途径中，叶绿体在成团之前先变得有棱角，然后碎裂变成许多小块。这些不同的途径一定被一个或多个病毒基因所激活（Fraser and Matthews，1979b）。

基因组由两个或多个核酸分子组成的病毒的拟重组体（pseudorecombinant）可在实验室中创造出来。基因组片段间的重配使特定的病害症状决定子（determinant）能够被定位于特定的基因组片段之上。迄今已有许多关于具有DNA基因组和RNA基因组的病毒这类实验的报道。例如，已确定至少一些症状的决定子位于ACMV的DNA 1分子上（Stanley *et al.*，1985）。只用数种病毒株系在几种寄主上的测试不可能揭示所

涉及的全部基因组片段。因此，Rao 和 Francki（1982）通过对 CMV 3 个株系的 3 个基因组 RNA 片段成对交换在体外构建了 18 个拟重组体。并将这些拟重组体在 10 种寄主植物上进行了测试。一些寄主的反应由 RNA 2 或 RNA 3 单独决定，但是其他反应则源自两个 RNA 分子之间的互作。还有些反应或许涉及所有的 3 个基因组片段。虽然这样的重配（reassortment）实验已经产生出有用的数据，但它们并不能使人们每次都能精确地找到所涉及的基因，因为基因组片段时常编码一个以上的蛋白质产物。

得到病毒的侵染性克隆并通过诱变操纵这些基因组的能力，已经使我们在鉴定涉及决定症状的基因或非编码区方面取得了主要进展。有关这一手段的例子将在本章中讨论。

在考虑病害的诱发方面，有必要对病毒基因在病毒侵染周期中的功能以及这些基因对寄主的效应（effect）之间加以区别。在正常情况下，一个病毒基因组的所有基因产物对于病毒完成侵染循环至少具有一种功能。迄今尚没有证据表明存在着只在诱发病害方面有作用的病毒基因。

如果我们考虑多种寄主和环境条件（参见第 12 章第Ⅱ节），一个特定的病毒能引起的症状类型远多于其基因产物种类，即比一起作用的两个甚至更多的基因产物的组合还要多。我们的结论是，一个特定的病毒基因可能在产生病害的类型上有多种效应，这取决于所涉及的寄主植物、环境条件以及与其他病毒基因的可能的互作。

目前，我们能区别病毒基因的 3 种效应：①基于对一种必要的病毒功能的特别需求的效应。叶绿体膜中的 TYMV 诱发的小泡（vesicle）（图 8.15）可能是这种类型的一个例子。②基于病毒基因的一个缺陷性的效应，如细胞间的转运功能，导致侵染局限于侵入点。③基于（就病毒复制或移动而言不太重要的）病毒侵染的效应，严重损害寄主细胞使得进一步的复制受到抑制的情况除外。

许多病毒侵染并不表现出可见的宏观病害症状。然而，除了隐潜病毒（cryptic viruses）之外，大多数病毒产生可观察到的，而且在其至少一种寄主中时常存在的特征性细胞学效应（参见第 3 章第Ⅳ节）。因此，就上面③所述的意义而言，病毒诱发的大多数宏观病害可能是不重要的，然而一些细胞学效应可能代表了病毒复制与移动的基本需求。宏观病害症状本质上应该看作是病毒对其细胞环境的效应，而不是病毒表型的一部分。从表 10.1 可以看出，在建立完全系统性病害的过程中，病毒必须克服各种不同的障碍。下面将讨论从起始侵染到病毒性病害的完全系统性表现的过程以证明在病毒的侵入和寄主的抗性之间存在的互作。

A. 病毒在初侵染细胞中复制的能力

迄今涉及非寄主（non-host）中控制或抑制病毒复制的因素的研究很少。这是因为这些实验必须在单细胞水平进行，并且自然首先要为病毒的寄主（而不是非寄主）建立原生质体系统。因此，尚不清楚完整植株表现为明显的非寄主植物在单细胞水平也不能支持病毒复制的植物的比例。如第 7 章第Ⅱ节所述，一个最初受到侵染的细胞中病毒复制最早的事件之一是病毒粒体的脱壳。各种不同的证据显示这一过程没有或基本不涉及寄主专化性。因此，就 TMV（Kiho *et al.*，1972）与 TYMV（Matthews and Witz，1985）而言，病毒在非寄主植物中的脱壳如同在寄主植物中一样容易。然而，对于这些

实验所用的非寄主植物种是否可以支持病毒的复制以及所观察到的现象是否因不能移动到毗连细胞而导致的阈下侵染（subliminal infection）尚不确定。就 RNA 病毒而言，有证据表明寄主的蛋白质或寄主因子参与了病毒的复制（参见第 8 章第Ⅳ节 E.5）。同样地，双生病毒（geminiviruses）的复制必须利用其寄主的 DNA 聚合酶系统（参见第 8 章第Ⅷ节 D.4）。因此，很有可能在病毒增殖（multiplication）这一步骤，植物和病毒间的不亲和性（incompatibility）可避免病毒的复制。原生质体对侵染的各种形式的抗性表明某些抗性基因在单细胞水平起作用。这类抗性称为极端抗性（extreme resistance）。

1. TMV 和番茄的 *Tm-1* 基因

在番茄植株中 TMV 的增殖因 *Tm-1* 基因的存在而受到抑制，在纯合子（*homozygote*）（*Tm-1 Tm-1*）中的抑制比在杂合子（heterozygote）（*Tm-1*/+）中的抑制更有效（*Fraser et al.*，1980；Watanabe *et al.*，1987c）。在放线菌素 D（actinomycin D）存在时，*Tm-1* 抗性亦可在原生质体中表达（Motoyoshi and Oshima，1977；Watanabe *et al.*，1987 c）。因此，*Tm-1* 抗性可被视为极端抗性。

TMV 的一个无毒（avirulent）株系与一个强毒（virulent）株系的序列比较揭示了两个碱基的替换造成复制酶 130 kDa 与 180 kDa 蛋白质中氨基酸的改变（位于 979 位的谷氨酸变成谷氨酰胺，位于 984 位的组氨酸变成酪氨酸）（Meshi *et al.*，1988）。

有侵染性的转录物的诱变表明两个相伴随的碱基置换以及可能导致的氨基酸变化，参与了番茄 *Tm-1* 基因对该 *Avr* 基因的识别。

2. PVX 和马铃薯的 *Rx* 基因

分别位于第Ⅻ号和第Ⅴ号染色体上的 *Rx1* 与 *Rx2* 基因为马铃薯提供了对 PVX 的极端抗性（Ritter *et al.*，1991；Bendahmane *et al.*，1997）。该 *Rx1* 基因与抗线虫基因 *Gpa2* 紧密地连锁（Rouppe van der Voort *et al.*，1999）。*Rx* 抗性通过抑制 PVX 的积累在原生质体中起作用（Adams *et al.*，1986；Bendahmane *et al.*，1995）。在 TMV 和 CMV 联合侵染的原生质体中，这两种病毒的增殖水平也受到抑制（Köhn *et al.*，1993；Bendahmane *et al.*，1995）。抗性以株系专化性方式受到病毒外壳蛋白的激发（Kavanagh *et al.*，1992；Bendahmane *et al.*，1995），而且通过 PVX 序列的比较和诱变，外壳蛋白的第 121 位氨基酸残基被认为是打破抗性活性的主要决定因素（Querci *et al.*，1995）。抗性在接种病毒之前已表达（Gilbert *et al.*，1998）。这种极端抗性与过敏性反应（hypersensitive response，HR）并不相关。

Rx1 基因已经被分离并且在分别被转化进本生烟（*N. benthamiana*）和普通烟草（*N. tabacum*）内后发挥了作用（Bendahmane *et al.*，1999）。该基因的序列表明它包含 3 个外显子和 2 个内含子，而且包含单一可读框，可编码一个 107.5 kDa 的蛋白质（Bendahmane *et al.*，1999）。其一级结构与 LZ-NBS-LRR 族的 *R* 基因类似（图 10.2）。因此，*Rx* 与诱发 HR 的 *R* 基因类似，但是表型分析表明 *Rx* 介导的抗性与 HR 无关。然而，当 PVX 强株系的外壳蛋白在具有 *Rx* 基因的转基因本生烟中以组成型方式表达时，在 72 h 内会出现导致所处理区域完全死亡的坏死反应。该实验表明 *Rx* 介导的过

敏性反应（HR）是有可能发生的，但这种情况在病毒侵染期间从 PVX 基因组表达外壳蛋白时并不发生。为了验证极端的抗性和 HR 之间的关系，Bendehmane 等（1999）用携带 *N* 基因的烟草（*N. tabacum*）植株做了一个实验（参见第Ⅲ节 D.3），这些植株中有的只携带 *N* 基因，有的除 *N* 基因外还携带着转基因——*Rx* 基因。用表达一个致病性强的 PVX 株系（TMV-KR）或一个无毒株系（TMV-TK）的外壳蛋白的重组体 TMV 挑战接种这些烟草植株；结果表明，TMV-TK 含有诱发 *Rx* 和 *N* 介导的抗性的激发子（elicitor）。TMV-KR 和 TMV-TK 均可在表达 *N* 基因的烟草植株上诱发 HR，而且 TMV-KR 在具有 *N*+*Rx* 基因型的烟草上亦可诱发 HR。然而，用 TMV-TK 接种 *N*+*Rx* 基因型的烟草植株未产生 HR。这些结果表明，*Rx* 介导的极端抗性在 *N* 基因介导的抗性之前被激活，因此极端的抗性与 HR 相比是上位的（epistatic）。

Rx2 基因也已被克隆与测序（Bendahmane *et al.*，2000），而且可编码与 *Rx1* 和 *Gpa2* 的产物非常相似的一种蛋白质。

3. PSbMV 和豌豆的 *sbm* 基因

包含 *sbm-1*、*sbm-3* 和 *sbm-4* 基因的植物，在豌豆（*Pisum sativum*）的第 6 号染色体上密切连锁，分别不能支持 PSbMV 致病型（pathotype）1、3 和 4 的复制；*sbm-2* 和 *sbm-3* 的性质相同，但是位于不同的连锁群中（Hagedorn and Gritton，1973；Provvidenti and Alconero，1988a，b）；PSbMV 抗性基因 *sbm-2* 赋予对致病型 2 的抗性，位于第 2 号染色体上（Provvidenti and Alconero，1988a）。致病型 1 在 *sbm-1* 原生质体或植株中不能复制。在对 *sbm-1* 植株的联合侵染中，对致病型 4 的复制没有抑制，对致病型 1 的复制也没有互补作用（Keller *et al.*，1998）。

Keller 等（1998）使用致病型 1 和 4 间的重组体病毒，证明了 PSbMV 的致病力与 21 kDa 的基因组连锁蛋白（VPg）相关。因为 VPg 很可能参与病毒的复制，一般认为 *sbm-1* 基因可能干扰 VPg 在复制中的作用。

B. 病毒从第一个细胞迁移出的能力

对一个病毒从最初侵染的细胞到毗连细胞移动的主要限制因素是其打开胞间连丝孔口的能力。这点在第 9 章（第Ⅱ节 D 部分）已详细地讲述过。然而，也可能有其他的因素影响病毒移动的能力。正如下文所述，病毒可能被 HR 限制于少数细胞中，从而产生一个可见的枯斑。在单细胞水平过敏性反应的诱发不易看清，因此，可能尚未得以识别。

C. 局部性过敏反应

如果病毒能够从初侵染的细胞移动出来就可能引起局部性过敏反应。只有在某些情况下像接种体强度非常高而且持续进行接种时才可能发生这种过敏反应，如嫁接之后（参见菜豆中的 *RSV-1* 基因介导的由 SMV 引起的过敏反应）（Hajimorad and Hill，2001）。

局部枯斑的结构已在第 3 章（第Ⅱ节中 A 部分）描述过。引起局部坏死斑的一些病毒诱导非特异性寄主反应，包括寄主编码蛋白质的从头合成（*de novo* synthesis）。针

对重复侵染（superinfection）的局部和系统性抗性的发展紧随着局部坏死斑的发展。各种不同的病毒-寄主组合的局部枯斑反应可用于病毒诊断以及侵染性病毒浓度的分析中（第15章第Ⅱ节A.1）。在侵染位点附近的组织中病毒复制的局部化，即HR（表10.1），作为对病毒侵染的田间抗性（field resistance）的基础在农业和园艺领域具有重要作用。这些现象已经成为许多项研究的主题并且已由Ponz和Bruening（1986）、Bol（1988）、Bol和van Kan（1988）、van Loon（1989）和Culver（1997）做过综述。

许多病毒-寄主组合产生局部坏死斑，并且日益增多的寄主和病毒的遗传决定因素已经得到鉴定（表10.2）。

表10.2 参与过敏性反应的病毒与寄主基因

病毒	病毒基因	寄主	寄主基因
烟草花叶病毒	外壳蛋白	烟草	*N'*
		辣椒	L^1、L^2、L^3
		茄子	?
	30 kDa移动蛋白	番茄	*Tm-2*、$Tm\text{-}2^2$
	复制酶（解旋酶域）	烟草	*N*
花椰菜花叶病毒	基因Ⅵ	烟草 曼陀罗	?
番茄丛矮病毒	p19与p22	烟草	?
黄瓜花叶病毒	2a聚合酶	豇豆	?
马铃薯X病毒	外壳蛋白	马铃薯	*Nx*
	25 kDa移动蛋白	马铃薯	*Nb*
大麦条纹花叶病毒	RNAγ	苋色藜	?

在完整的植株或切开的叶块中可诱导HR的基因，在分离的受侵染原生质体中不能诱导HR。烟草的*N*基因（Otsuki *et al.*，1972 b）和番茄的*Tm-2*与$Tm\text{-}2^2$（Motoyoshi and Oshima，1975，1977）基因就属于这种情况。携带这些基因的纯合型的植物原生质体允许TMV复制而未导致细胞的死亡。据认为这种作用可能是由于表皮（epidermis）参与了坏死反应（Motoyoshi and Oshima，1975，1976），或者细胞间的连接对过敏性反应表现型的表达是必需的（Motoyoshi and Oshima，1977）。另一个解释（或许是更加可能的解释）是，细胞壁的存在可能对*N*基因的表达是必需的。一些过氧化物酶看来参与了坏死反应。这些酶可能主要位于细胞壁区室（compartment）中。因此，细胞壁的去除可能在导致细胞死亡的生物化学反应链上造成了一个缺口。

D. TMV在N基因烟草中诱发的HR

1. TMV侵染N基因烟草所形成的枯斑的特性

在正常温度下，烟草的一些品种对除ob株系以外所有已知的烟草花叶病毒属病毒侵染的反应是产生局部坏死斑并且不发生系统性扩展，而不产生随后通常会导致花叶的局部褪绿斑（Tobiás *et al.*，1982；Padgett and Beachy，1993）（Culver *et al.*，1991）。该HR在28℃以上（Samuel，1931）或有时在稍低的温度（White and Sugars，1996）

下被克服。在一些烟草品种中，该反应是在单一显性的基因 *N* 基因控制之下，*N* 基因最初存在于心叶烟（*N. glutinosa*）中（Holmes，1938）。该基因已被掺入（incorporated）到普通烟草（*N. tabacum*）栽培品种三生烟（Samsun）、NN（Holmes，1938）、白肋烟（Burley）、NN（Valleau，1952）以及珊西烟（Xanthi-nc）（Takahashi，1956）中。在非常幼小的籽苗上，含有 *N* 基因（*NN* 或 *Nn*）的植株会发生系统性坏死。在较老的植株上，通常可观察到对侵染的仅有的两种反应：在 *NN* 与 *Nn* 植株上的局部性坏死斑，以及 *nn* 植株的系统性花叶（Holmes，1938）。然而，系统性坏死亦可能在一些较老的含 *N* 基因的植株上发生（Dijkstra *et al.*，1977）。

TMV 侵染包含 *N* 基因的烟草后在侵染位点造成细胞死亡，在紧邻（并且局限于）坏死斑的区域存在着病毒粒体（Da Graca and Martin，1976）。TMV 侵染含有 *N* 基因的烟草品种 Xanthi-nc 可诱发局部枯斑，将一种荧光染料通过微注射（micro-injection）输入局部枯斑周围的叶肉细胞之内，结果表明胞间连丝功能的缺损至少是一些限制病毒扩散的晚期局部性防卫反应的原因（Susi，2000）。

2. TMV 的解旋酶域诱导含 *N* 基因植株的坏死

现在有关含 *N* 基因的烟草对 TMV 的 HR 反应的假说是，一种 TMV 蛋白质直接或间接地与 N 蛋白互作因而激活了导致 HR 的信号转导途径。已用两种手段鉴定 HR 的激发子。第一种手段，对正常情况下致病力强的、可诱发 HR 的 TMV 的 ob 株系的突变体的分析说明基因组的复制酶编码区（126/183 kDa 蛋白质的基因）参与了 HR 的诱发（Padgett and Beachy，1993）。通过使用嵌合体（杂种）病毒的基因组和进一步的诱变，将相关的位点缩小到了复制酶区域的解旋酶域（Padgett *et al.*，1997）。第二种手段，将 TMV 的可读框在三生烟（Samsum）NN 植株中进行瞬间表达（Abbink *et al.*，1998；Erickson *et al.*，1999）。移码突变表明蛋白质（而非 mRNA）与 HR 的诱发有关。126 kDa 蛋白质的解旋酶域的表达也诱发 *PR-1* 基因的表达（Abbink *et al.*，1998）。183 kDa 蛋白质、移动蛋白（P30）或外壳蛋白均不能诱发坏死。由于 183 kDa 蛋白质是通过 126 kDa 蛋白质基因的通读而表达出来的，前者也应该可以诱导坏死；然而，或许由于其表达量太低而不足以诱导产生反应。

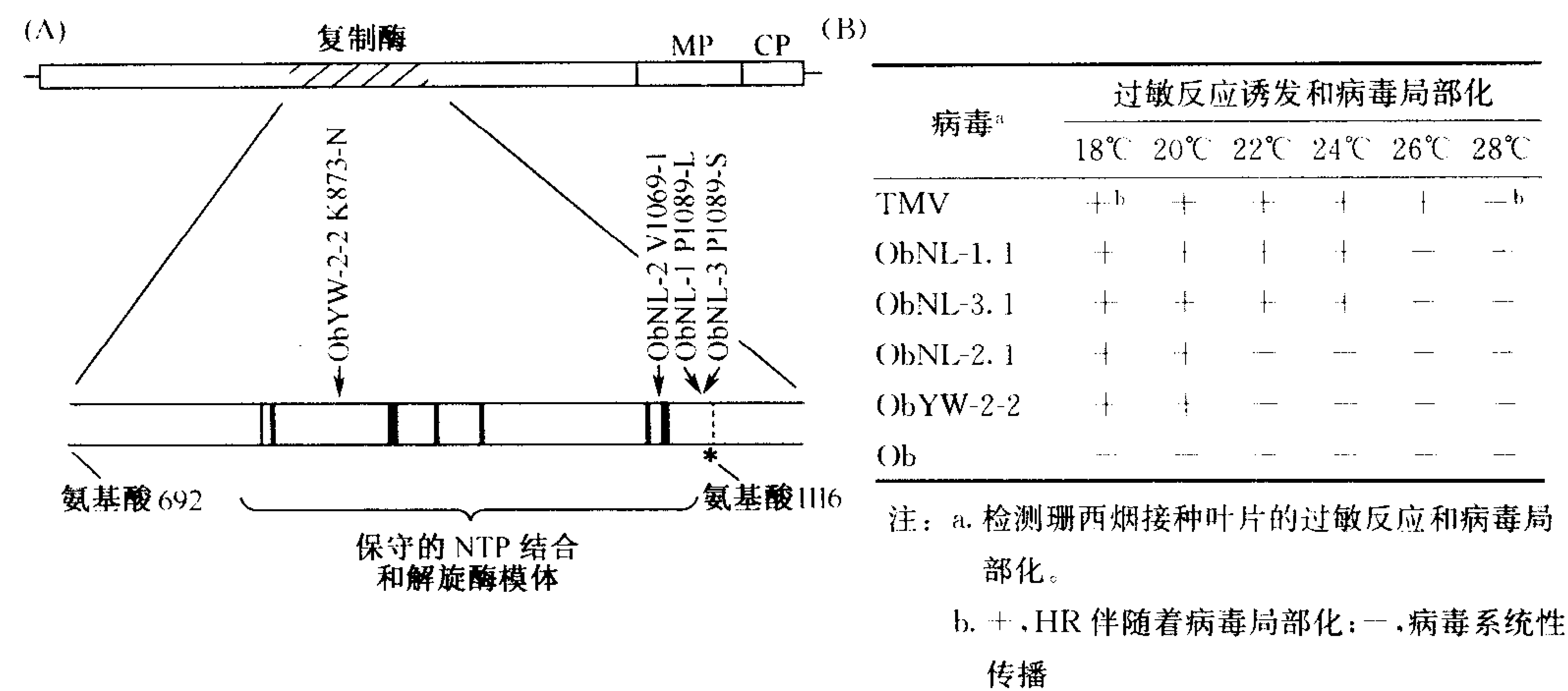
解旋酶域也编码腺苷三磷酸酶（ATPase）活性；虽然该域的突变使 ATPase 丧失了活性，但是它不影响 HR 的诱发（Erikson *et al.*，1999）。

N 基因对 TMV 的 HR 反应是温度敏感型的，在 28℃ 以上受到钝化。然而，TMV ob 株系的解旋酶域的突变体在较低的温度下也能够克服 HR（图 10.3）（Padgett *et al.*，1997）。据推断，在较高的温度下，病毒的激发子和导致 HR 的寄主监视机制（host surveillance mechanism）之间的互作受到削弱。

3. *N* 基因

使用玉米的激活子转座子（activator transposon）通过转座子标签法（transposon tagging）已经将 *N* 基因分离（Whitham *et al.*，1994；Dinesh-Kumar *et al.*，1995）与鉴定。*N* 基因的序列表明它编码一个 131.4 kDa 蛋白质，其氨基末端域与果蝇（*Drosophila*）的 Toll 蛋白和哺乳动物白细胞介素-1（interleukin-1）的受体的细胞质域

相似，含有核苷酸结合位点（nucleotide binding site，NB）和4个不完全的（imperfect）富亮氨酸（leucine-rich）区域（图10.4）。因此，它属于*R*基因的TIR-NB-LRR族（图10.2）。



病毒[a]	过敏反应诱发和病毒局部化					
	18℃	20℃	22℃	24℃	26℃	28℃
TMV	+[b]	+	+	+	+	−[b]
ObNL-1.1	+	+	+	+	−	−
ObNL-3.1	+	+	+	+	−	−
ObNL-2.1	+	+	−	−	−	−
ObYW-2-2	+	+	−	−	−	−
Ob	−	−	−	−	−	−

注：a. 检测珊西烟接种叶片的过敏反应和病毒局部化。

b. +，HR伴随着病毒局部化；−，病毒系统性传播

图10.3 TMV中诱发HR的区域的鉴定。（A）TMV Ob株系126/183 kDa基因的突变导致HR的诱发。基因组图中画斜线的区域代表TMV复制酶中对N基因介导的HR诱发所必需的区域（第692～1116位氨基酸）。底部为Ob株系复制酶中的该区域的放大图，标明了Ob株系中诱发HR的位置。黑色竖线代表核苷三磷酸结合域和解旋酶保守区模体。星号“*”表示126/183 kDa蛋白质中琥珀终止密码子。（B）N蛋白对TMV Ob和ObNL突变体的温度敏感性。承蒙版权所有者The American Phytopathological Society惠允，引自Padgett等（1997）。

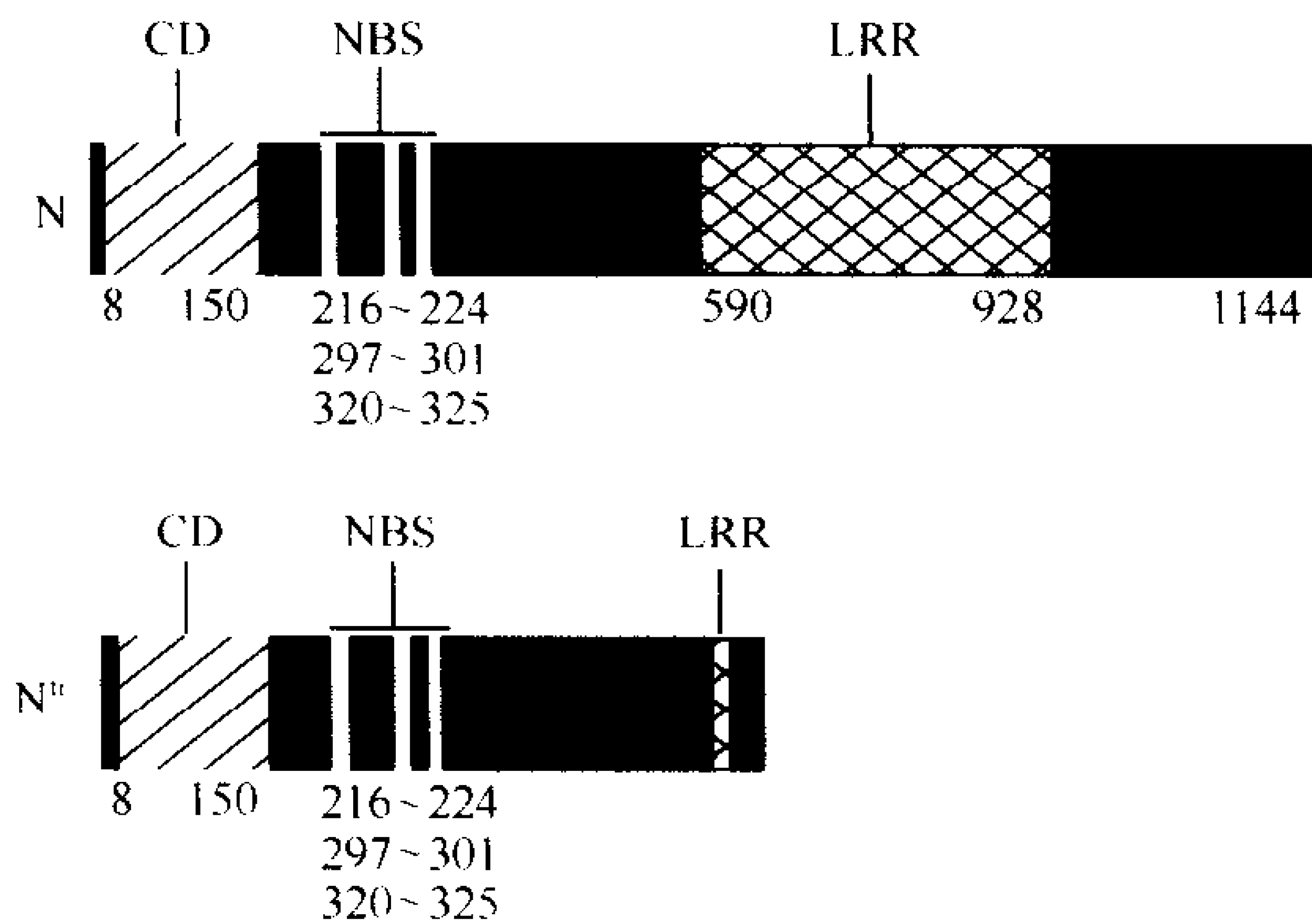


图10.4 N蛋白和N[tr]蛋白的示意图。通过N蛋白氨基酸序列分析鉴定出了3个可能具有功能的结构域。全长N蛋白中的这些结构域均已按比例标出。CD，为N蛋白中推定的细胞质域，与Toll、白细胞介素1受体和MyD88的胞质域具有序列相似性；NBS，推定的核苷酸结合位点，包括由第216～325位氨基酸组成的3个模体；LRR，富亮氨酸重复区，由14个串联的不完整的富亮氨酸重复序列组成。替代剪接产生截短的蛋白质N[tr]。除C端的36个氨基酸外，N[tr]与N蛋白的氨基末端相同，由右边毗邻LRR的黑框表示。承蒙版权所有者© The National Academy of Sciences，USA惠允，引自Dinesh-Kumar和Baker（2000）。

缺失分析表明 TIR、NB 与 LRR 域在 HR 的诱发方面都具有不可缺少的作用(Dinesh-Kumar *et al.*, 2000)。

N 基因产物是经由替代剪接途径（alternative splicing pathway）从两个转录物(transcript) N_S 与 N_L 上表达出来的（Dinesh-Kumar and Baker, 2000)。N_S 转录物编码全长的 N 蛋白，并且在 TMV 侵染前和侵染 3h 之后量更大。N_L 转录物编码一个截短的（truncated）N 蛋白（N^{tr}），缺少 14 个富亮氨酸重复中的 13 个，而且在侵染后 4～8 h 量更大。一个转化后表达 N 蛋白、但不表达 N^{tr} 蛋白的对 TMV 敏感的（TMV-sensitive）烟草品种易于感染 TMV，而表达 N_S 和 N_L 两种转录物的转基因植株是完全抗病的。然而，在 TMV 侵染前后 N_S mRNA 与 N_L mRNA 的比率是关键性的（critical)，因为若只有一种 mRNA 表达或二者之比为 1：1 时，产生不完全的抗性。据认为，这两种 N 信息（mRNA）的相对比率受到某些 TMV 信号的调控（Dinesh-Kumar and Baker, 2000)。

将 *N* 基因转移到番茄中，会使番茄产生对 TMV 的抗性（Whitham *et al.*, 1996)。

E. 其他的病毒-寄主过敏性反应

1. TMV 与 *N′* 基因（Culver *et al.*, 1991)

最初来自绒毛烟（*N. sylvestris*）的 *N′* 基因，控制针对大多数烟草花叶病毒属病毒(tobamoviruses) 的 HR，但是 TMV 的 U1（vulgare，普通）和 OM 株系除外，因为 U1 与 OM 株系可在含有 *N′* 基因的植物中系统性移动而且产生花叶症状。然而，作为引起系统性症状的病毒株系的自然突变体，可诱发坏死的突变体能被轻易地分离出来。TMV 的外壳蛋白基因参与了含 *N′* 基因的植物 HR 的诱发（Saito *et al.*, 1987a)。5 个独立的氨基酸替换已被确认参与了 HR 的激发（Culver and Dawson, 1989; Culver *et al.*, 1991)，但是与每个突变相关的 HR 反应有所不同，强激发子在 2～3 天后即激发产生可见的坏死，而弱激发子需要至少 6 天才导致坏死。这说明外壳蛋白的结构可能影响寄主植物的反应。为了阐明其中的原因，Culver 等（1994）做了一系列氨基酸替换以使外壳蛋白上产生可预测的结构改变，并且研究了它们对 HR 的影响。激发 HR 的氨基酸替换位于（或经预测可能干扰）有序集聚的外壳蛋白的毗邻亚基之间的接口（interface）区域（有关 TMV 的结构见第 5 章第Ⅲ节 B. 5)。不能激发 HR 的氨基酸替换或者是保守性的，或者位于接口区域之外。诱发 HR 的氨基酸替换形成的杆状粒子的四级结构的稳定性降低，一个外壳蛋白激发 HR 的强度与四级结构的去稳定（destabilization）程度有相关性。然而，影响外壳蛋白的三级结构的突变不激发 HR。据认为，为了激发 HR，变弱的四级结构暴露出一个受体结合部位（Culver *et al.*, 1994)。很可能是在激发子中，小的外壳蛋白的聚集体的体积分布和（或）寿命使得 *N′* 基因能够识别入侵的病毒（Toedt *et al.*, 1999)。

为了进一步鉴定激发子的位点，Taraporewala 和 Culver (1996) 研究了与外壳蛋白的已知三级结构有关的各种不同的氨基酸替换（TMV 外壳蛋白三级结构的细节见第 5 章第Ⅲ节 B. 3)。他们证明破坏外壳蛋白 α 螺旋束（α-helical bundle）正表面（right face）的氨基酸替换干扰了 *N′* 基因的识别。激发子活性部位约占 600 Å²，由 30% 极性

的、50%非极性的和20%带电荷的氨基酸残基组成。通过比较各种烟草花叶病毒属病毒的外壳蛋白和在这些外壳蛋白中氨基酸的替换对 N'基因 HR 的影响，揭示了由非保守的表面特征（surface feature）围绕着的保守性中央疏水腔（hydrophobic cavity）的存在（Taraporewala and Culver，1997）。这些结果说明 N'基因的专化性除了依赖于激发子内活性部位（active site）的特异性表面特征之外，也依赖于外壳蛋白的三维折叠（图 10.5）。

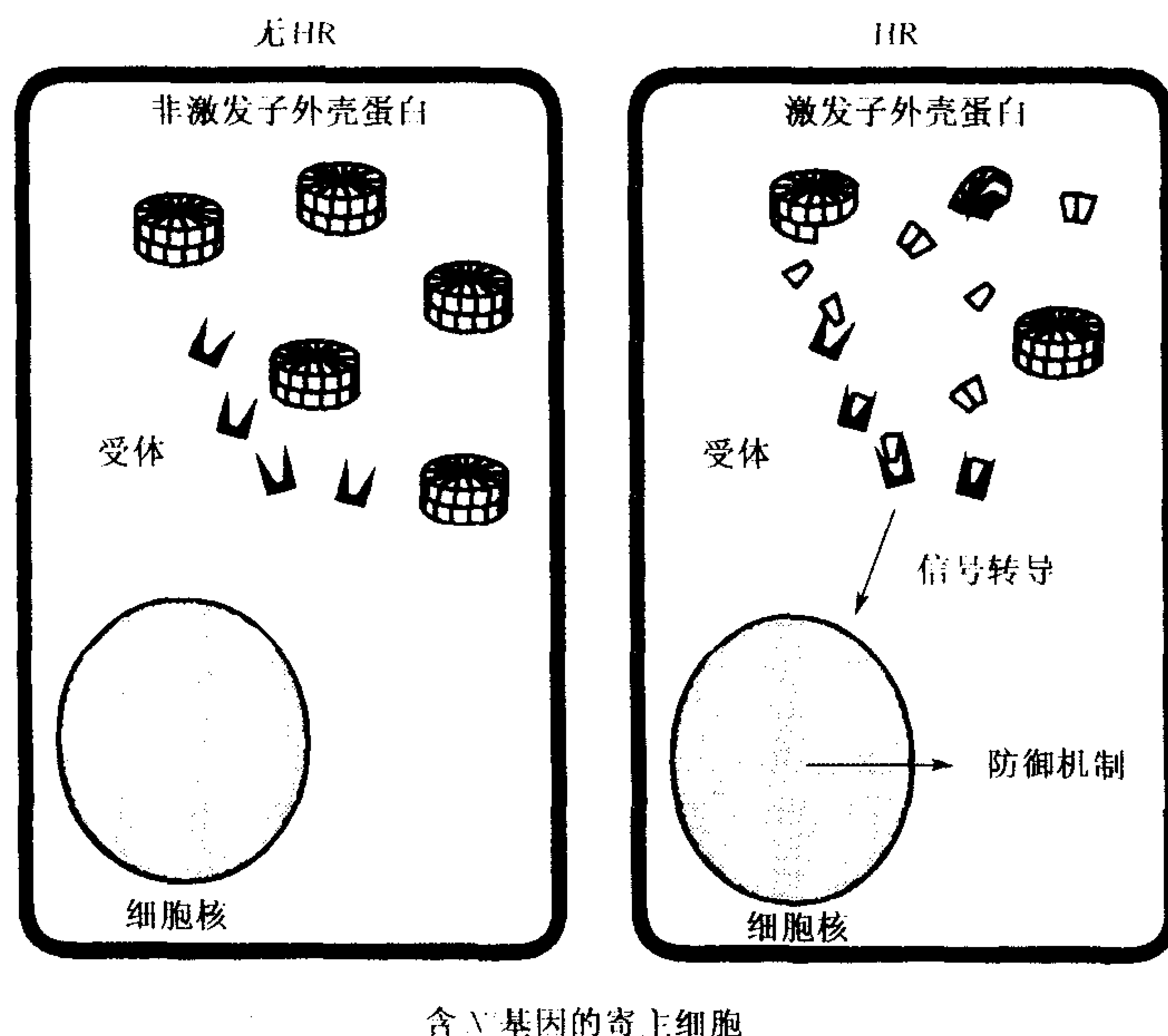


图 10.5　解释作为激发子和非激发子的 TMV 外壳蛋白对诱发 N'基因过敏反应作用的模型。经惠允，引自 Culver（1997）

2. TMV 和辣椒的 *L* 基因

辣椒属植物（*Capsicum* spp.）携带控制对 TMV HR 的抗性的基因 L^1（*C. annuum*）、L^2（*C. frutescens*）和 L^3（*C. chinense*）；茄子（*Solanum melongena*）中也有遗传学方面尚未鉴定的 HR（Berzal-Herranz *et al.*，1995；Dardick and Culver，1997；de le Cruz *et al.*，1997；Dardick *et al.*，1999）。这些基因各自控制的每一个 HR 均通过 TMV 的外壳蛋白诱发。TMV U1 的外壳蛋白基因被 TMV 的其他株系替换所得到的嵌合体构建物（chimeric construct）的表现说明 U1、U2、ORSV 与 CGMMV 的外壳蛋白激发了辣椒（L^1基因）的表现型相似的 HR。U1 与 CGMMV 的外壳蛋白分别不激发烟草和茄子的 HR（Taraporewala and Culver，1997；Dardick and Culver 1997）。Dardick 等（1999）比较了在烟草、辣椒和茄子中 HR 的激发，证明 α 螺旋束在所有情况下都是必要的。识别的差异被认为起因于这些寄主如何感受了外壳蛋白的表面特征及（或）四级构型。这表明这些抗性基因在功能上是相关的，而且可能在结构上是同源的。

3. TMV 和番茄的 *Tm-2* 基因（Culver *et al.*，1991）

番茄中有 *Tm-2* 和 $Tm\text{-}2^2$ 两个等位基因，对 ToMV 的某些株系产生 HR（表 10.3）。HR 除了由病毒株系决定外，也依赖于番茄的基因型和环境条件，尤其是温度。寄主的反应差异显著，包括非常轻的坏死斑导致的明显的阈下侵染、正常的局部坏死斑至系统性坏死。

表 10.3 抗 ToMV 的番茄植株与该病毒株系间的基因互作[a]

寄主基因型[b]	病毒基因型					
	0	1	2	2^2	1.2	1.2^2
野生型	M	M	M	M	M	M
Tm-1	R	M	R	R	M	M
Tm-2 *	R	R	M	R	M	R
$Tm\text{-}2^2$ *	R	R	R	M	R	M
Tm-1/*Tm-2*	R	R	R	R	M	R
Tm-1/$Tm\text{-}2^2$	R	R	R	R	R	M
Tm-2/$Tm\text{-}2^2$	R	R	R	R	R	R
Tm-1/*Tm-2*/$Tm\text{-}2^2$	R	R	R	R	R	R

注：a. 修改自 Fraser（1985）；b. 用毒性株系接种后，具有标记着 * 基因型的植株可能会表现局部坏死与程度不同的系统坏死而非花叶症状；M＝系统花叶；R＝抗性。

通过对诱发 HR 和非诱发 HR 的 TMV 分离物的序列比较以及诱变和嵌合体病毒的利用，30 kDa 移动蛋白（MP）已经被确认为 *Tm-2* 与 $Tm\text{-}2^2$ 植株 HR 的诱导物（Culver *et al.*，1991；Calder and Palukaitis，1992；Weber *et al.*，1993）。将可打破 *Tm-2* 抗性的分离物（Ltb1 和 C32）与野生型分离物的序列加以比较，识别了 Ltb1 中两个氨基酸的差异（68 位的 Lys 变为 Glu，133 位的 Phe 变为 Cys）以及 C32 中两个氨基酸的差异（52 位的 Glu 变为 Lys，133 位的 Glu 也变为 Lys）。在可打破 $Tm\text{-}2^2$ 植株抗性的分离物中，氨基酸的替换发生于 MP 的 C 端（238 位的 Ser 变为 Arg，244 位的 Lys 变为 Glu）（Weber *et al.*，1993）。MP 的 C 端区域，包括发生两个替换的位点，对于细胞间移动是不必要的（Weber and Pfitzner，1998）（图 9.6）。即使如此，现在看来这两种抗性基因作用的发挥均经由 HR，而非由于对 MP 从最初侵染的细胞向外移动的非亲合性抑制（Weber and Pfitzner，1998）。

近年已经获得了一个与番茄的 $Tm\text{-}2^2$ 抗性基因连锁的序列特征化扩增区域（sequence-characterized amplified region，SCAR）标记（Dax *et al.*，1998）。

4. PVX 和马铃薯的 *N* 基因

在马铃薯中针对 PVX 的 HR 受到两个基因 *Nb* 和 *Nx* 的控制。*Nb* 已被定位于染色体Ⅴ上臂的一个抗性基因簇（De Jong *et al.*，1997；Rouppe van der Voort *et al.*，1998），而 *Nx* 被定位于染色体Ⅸ上一个含有类似 TSWV 抗性基因 *Sw-5* 的区域（Tommiska *et al.*，1998）。

为了鉴定 *Nb* HR 的病毒激发子，构建了 PVX 无致病力株系和有致病力株系的杂种病毒（Malcuit *et al.*，1999）。*Nb* 无毒决定子已被定位于 PVX 编码 25 kDa 移动蛋白的基因上。在该蛋白质第 6 位的异亮氨酸已被证明参与了激发子的功能。然而，这个氨基酸存在于可打破抗性的株系 HB 中，因而可能作为被 *Nb* 基因产物特异性识别的无毒域（avirulence domain）三维结构的一个决定因素（Malcuit *et al.*，1999）。

Nx 介导的抗性受到 PVX 外壳蛋白基因的激发（Kavanagh *et al.*，1992），这里第 78 位氨基酸是一个重要的决定因素（Santa Cruz and Baulcombe，1993）。

一般多重的毒力（致病力）/无毒（无致病力）决定子是经过趋同进化（convergent evolution）而非经过重组被 PVX 获得的（Malcuit *et al.*，2000）。

5. TCV 与拟南芥的 *HRT* 和 *rrt* 基因

用 TCV 接种拟南芥生态型 Di-0 或 Di-17 导致了接种叶上的 HR（Simon *et al.*，1992；Dempsey *et al.*，1993，1997）。HR 是由位于染色体Ⅴ、编码典型的亮氨酸拉链 NBS-LRR 蛋白的一个显性基因 *HRT*（Dempsey *et al.*，1997）决定的（Cooley *et al.*，2000）。*HRT* 与决定对一种卵菌（oomycete）——寄生霜霉（*Peronospora parasitica*）的抗性相关的 *RPP*8 基因家族有着较高的同源性。TCV 外壳蛋白即被 HRT 识别的 Avr 因子，外壳蛋白 N 端的突变产生了不能诱导 HR 的 TCV 的高致病力（hypervirulent）株系（Oh *et al.*，1995；Wang and Simon，1999；Cooley *et al.*，2000）。HRT 可能不足以产生完全的抗性，因为许多 *HR*⁺ 后代受到系统侵染（Kachroo *et al.*，2000）。现在已经鉴定了一个调节对 TCV 抗性的隐性等位基因 *rrt*（Kachroo *et al.*，2000）。

6. CaMV 与茄科寄主

CaMV 的 D4 与 W260 株系诱导曼陀罗（*Datura stramonium*）、烟草属的 *N. bigelovii* 和 *N. edwardsonii* 的局部褪绿斑和系统性花叶病，但是 CM1841 株系诱导局部坏死斑，因而被限制于接种叶中（Schoelz *et al.*，1986；Schoelz and Shepherd，1988）。利用这两个株系构建的嵌合体病毒，证明 HR 受到基因Ⅵ的激发（CaMV 基因组的细节见第 6 章第Ⅳ节 A. 1）。这一推断通过含有表达 WD260 株系基因Ⅵ的双元载体的根癌土壤杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）浸润法（infiltration）得到确认（Palanichelvam *et al.*，2000）。变异分析和嵌合体鉴别了编码蛋白 N 端的基因Ⅵ的1/3参与了 HR 的激发（Wintermantel *et al.*，1993；Broglio，1995），而编码蚜虫传播因子的基因Ⅱ，也受到光线强度的影响（Qiu *et al.*，1997）。一个位于 W260 株系的位置 1628（基因Ⅱ的第 94 位氨基酸）的点突变体（point mutant）在低的光强度（light intensity）下可系统性侵染 *N. bigelovii*，但是在高的光强度下不引起系统性侵染，在两种条件下均可引起局部坏死枯斑；在两种光强度条件之下野生型 W260 均产生系统性侵染。因此，HR 以及 HR 区域里对病毒的遏制受到寄主、病毒株系和生长条件的调控。

7. 其他病毒

通过 TBSV 单个基因的表达，Scholthof 等（1995）证明移动蛋白 p22 与 *N. edwardsonii* 上的 HR 有关。p22 中与细胞间移动相关的氨基酸残基与那些激发 HR 的残

基是可以分开的（Chu *et al.*，1999）。不能进行细胞间移动的p22的3个突变体在*N. edwardsonii*上激发局部坏死斑，然而两个能进行细胞间移动的突变体诱发产生了褪绿斑和系统性侵染。豇豆对某些CMV株系（如Fny）侵染的抗性涉及HR和侵染的局部化（Kim and Palukaitis，1997），寄主的这类反应可以通过在病毒的2a聚合酶基因的两个位点（核苷酸1978与2007，密码子631与641）的突变而分开。对Fny株系两个位点的改变导致了没有HR的系统性侵染和原生质体中病毒合成的增加，然而只发生1978位的变化导致了系统性侵染、系统性HR以及原生质体中病毒RNA积累的增加。有人指出，在不发生HR的原生质体中RNA积累的抑制，会导致整个植株中侵染的局部化，而且不同的植物基因涉及了HR激发和局部化反应（Kim and Palukaitis，1997）。已经鉴别出豇豆品种Kurodane-Sanjaku中的一个*R*基因*Cry*，它控制对CMV株系Y的HR抗性。该抗性被CMV的一个豆科作物株系（CMV-L）所克服，而且点突变证明它的激发与2b复制酶（基因）中的631位氨基酸相关（Karasawa *et al.*，1999）。

由CMV在苋色藜（*Chenopodium amaranticolor*）中所引起的HR受到3a移动蛋白和3b外壳蛋白二者突变的影响。Canto和Palukaitis(1999b)认为，CMV从初侵染的细胞移动出来是引发HR所必需的。

两种菜豆金色花叶病毒属病毒（begomoviruses）BDMV和BGYMV分别侵染菜豆（*Phaseolus vulgaris*）的一些品种，某些品种针对BDMV产生HR。一系列含有BDMV和BGYMV序列的杂种DNA-B组分，与BDMV DNA-A或BDMV-A-绿色荧光蛋白共同接种品种Topcrop（对BDMV和BGYMV感病）以及品种Othello和Black Turtle Soup T-39（抗BDMV）的幼苗（Garrido-Ramirez *et al.*，2000）。BDMV的无毒决定因素（avirulence determinant）被定位于BV1 ORF并且很可能是BV1蛋白。BV1的产物是细胞核穿梭蛋白（nuclear shuttle protein）（参见第9章第Ⅱ节C），因此，代表了一类新的病毒无毒力决定因素。

F. 过敏性反应中寄主蛋白质的变化

在侵染点或其附近，HR涉及一系列的复杂生物化学的变化，包括细胞毒素——植物保卫素的积累、细胞壁中的胼胝质（callose）和木质素的沉积以及因植物细胞的迅速死亡而形成坏死斑（Dixon and Harrison，1990）。HR的调控同样复杂，涉及许多潜在的信号转导分子（包括活性氧、离子流、G蛋白、茉莉酸和水杨酸）的互相作用、蛋白质磷酸化级联（cascade）、转录因子的激活和通过多聚泛素（多聚遍在蛋白）（polyubiquitin）系统的蛋白质再循环作用等（Dangl *et al.*，1996；Hammond-Kosack and Jones，1996）。为了鉴定一些激发HR的烟草基因，Karrer等（1998）构建了正处于HR状态的烟草叶片cDNA文库，并且将cDNA克隆进了基于TMV的表达载体。来自该TMV载体的侵染性转录物被接种到珊西（Xanthi-nn）烟草（不带*N*基因）上，然后对那些产生HR的植株进行鉴定。在已测序的12个独立的克隆中，其中一个编码泛素（遍在蛋白）（ubiquitin），它可能通过共抑制（co-suppression）机制激发坏死反应。在针对病毒的HR期间观察到，除了PR蛋白质外，多种酶的活性亦均有所增加。过氧化物酶、多酚氧化酶（polyphenoloxidase）和核糖核酸酶活性均有所增加（Wagih and

Coutts, 1982)。苯丙醇类化合物（phenylpropanoid）的代谢强烈地受到各种病原（包括诱导 HR 的病毒）侵染的激活。这一激活作用导致衍生于苯丙氨酸的化合物（如类黄酮和木质素）的积累。例如，该途径的激活作用包括 O-甲基转移酶的从头（de novo）酶合成（Collendavelloo *et al.*, 1982）。van Kan 等（1988）鉴定了 Samsun NN 烟草的两个基因编码富甘氨酸的蛋白质，该蛋白质在针对 TMV 侵染的 HR 期间受到强烈的诱发。

在受烟草的 HR 影响的其他的以及在寄主反应中可能很重要的寄主蛋白质中，*myb* 癌基因的同源物的表达量增加（Yang and Klessig, 1996）、过氧化氢酶减少（Yi *et al.*, 1999），而富甘氨酸的 RNA 结合蛋白在 HR 早期阶段减少但在后期阶段增加（Naqvi *et al.*, 1998）。

在一种植物寄主和一种诱导坏死的病原之间的相互作用中，最早的可检测到的事件之一是乙烯（一种气体的植物逆境激素）的生产迅速增加。在针对病毒侵染的过敏性反应中，从叶片中释放出的乙烯量增加（Gáborjányi *et al.*, 1971）。用一个穿刺针将乙烯利（ethephon，一种释放乙烯的物质）引进叶片内可得到类似于烟草品种 Samsun NN 针对 TMV 的反应相关的变化，该事实是乙烯参与 HR 起始的良好证据（van Loon, 1977）。乙烯的早期暴发性生产与局限病毒的反应有关，但是乙烯生产的增加不是被坏死反应的起始（onset），而是由一件更早的事件决定的（De Laat and van Loon, 1983）。

一个病毒和一个寄主抗性基因之间互作的结果可能受到病毒的无毒力决定因素和寄主抗性决定因素之间的数量互作（quantitative interaction）的控制（Collmer *et al.*, 2000）。由菜豆栽培种的等位基因 I 控制的对 BCMV 的抗性依照等位基因的剂量和温度而改变，产生从免疫、过敏性反应抗性到系统性韧皮部坏死导致植株死亡的一系列反应。

在估计 HR 期间所有寄主蛋白质的这些变化的作用方面，应该记住一些变化实际上参与了寄主反应，而另一些变化是因寄主反应而引起的。目前，要区别这些作用是非常困难的。

G. 在过敏性反应期间其他的生物化学变化

已经观察到在过敏性反应期间许多其他的生物化学变化。例如，Uegaki 等（1988）发现了 19 种倍半萜类化合物（sesquiterpenoid），据认为它们是 TMV 接种的 *Nicotiana undulata* 中的逆境诱发的化合物。来自对 TMV 侵染产生过敏性反应的烟草叶片的富含膜的细胞组分（cellular fraction）中发现了强化的、依赖于 NADPH 的产生氧的系统。在对抗病毒侵染和其他逆境刺激的 HR 期间，豇豆叶细胞发生早期的电解质渗漏（electrolyte leakage）（Pennazio and Sapetti, 1981）。在烟草中由 TMV 所引起的局部坏死斑里面或附近组织中，游离的脱落酸浓度增加到常态的 18 倍（Whenham and Fraser, 1981）。发生系统获得抗性的 Xanthi NN 烟草叶片中的细胞激动素的含量有所增加（Balázs *et al.*, 1977）。

H. 系统性坏死

1. 特异性坏死反应

在某些情况下，由病毒侵染诱发的坏死不是被限制到局部斑里，而是发生扩散。这通常是指延伸到叶脉、正在扩展的局部枯斑，而且造成系统性细胞死亡。系统性坏死的范围可以是上部叶片的个别区域或零星坏死斑点，也可以是与花叶症状混合发生导致植株死亡的大面积坏死。系统性坏死的症状取决于寄主基因型、病毒株系和环境条件。

含有 *N* 基因的一些烟草属植物即使保持在 17～20℃，在 TMV 侵染之后也可能发生系统性细胞死亡的反应（Dijkstra *et al.*，1977）。一个氨基酸的替换可能使 TMV 的外壳蛋白从含有 *N′*基因的烟草 HR 的强激发子变为弱激发子从而造成坏死的系统性扩散（Culver and Dawson，1989）。

番茄品种 GCR 267 的 $Tm\text{-}2^2$基因是纯合的，在受到 ToMV-2^2侵染后 2～3 周形成系统性坏死。受到 ToMV-30. 2^2（野生型 ToMV 的30 kDa基因已经被 $Tm\text{-}2^2$ 的 30 kDa 基因取代）侵染后，导致很弱的症状，但后来发展成系统性坏死（Weber *et al.*，1993）。

克里夫兰烟（*N. clevelandii*）受到 CaMV 株系 D4 与 W260 的侵染后会导致 CaMV 基因 Ⅵ 激发的系统性细胞死亡（Király *et al.*，1999）。克里夫兰烟（*N. clevelandii*）与 *N. bigelovii* 之间的杂种第一代（F_1 代）用这些 CaMV 株系接种不产生系统性坏死，但用 W260 接种后产生了系统性花叶症状，然而 F_2 代植株发生分离，产生系统性花叶病与系统性死亡的比率为 3∶1。负责细胞死亡的植物基因已被命名为 *ccd1*。因此，系统性死亡表型基于 *ccd1* 与 CaMV 基因 Ⅵ 之间的互作而诱发（Király *et al.*，1999）。

2. 非特异性坏死

一些其他类型的坏死反应缺少专化性而且能在不同属的寄主中发生，显然不是以基因对基因的方式发生。TMV 外壳蛋白的一些缺失突变体可引起明显的非特异性坏死（Dawson *et al.*，1988；Dawson and Bubrick，1989）。

将 GCMV 的 RNA 2 的 5′非编码区克隆进入一个 PVX 载体，可在本生烟（*N. benthamiana*）、克里夫兰烟（*N. clevelandii*）与普通烟上诱导系统性坏死反应。GCMV 本身不侵染克里夫兰烟，而在侵染另外两种烟草时无症状或者产生非常轻的症状。

TMV 和 PVX 混合侵染番茄时能引起系统性坏死（彩色图版 3. 20）。

在第 3 章（第Ⅱ节 B. 5）中已描述过（坏死环显然遵循昼夜节律扩展）环斑症状。

I. 程序性细胞死亡与植物病毒

多细胞生物体具有某些机制以除去发育上错位或不必要的细胞或牺牲部分细胞以避免病原的扩散。该现象被称为程序性细胞死亡（programmed cell death，PCD）或凋亡（apoptosis）；凋亡是 PCD 的一种特例，有一系列清楚的生理学和形态学的特征（Mit-

tler and Lam，1996；Gilchrist，1998）。虽然有关PCD方面的许多工作已经在动物系统中完成，但是人们对植物中这一过程的兴趣逐渐增加。针对植物病原的HR反应与PCD有多种共同的特征（Mittler and Lam，1996；Mitsuhara *et al.*，1999；Pontier *et al.*，1999）。

某动物病毒能抑制PCD（Osborne and Schwartz，1994）。确定植物病毒是否有相似的性质将是相当有趣的事。

J. 局部获得性抗性（local acquired resistance）

已经利用带有*N*基因的烟草品种开展了许多研究。Ross（1961a）研究表明，在TMV侵染烟草品种Samsun NN产生的局部坏死斑周围1～2 mm区域表现对TMV的高度抗性（图10.6），在接种后6天抗性区域面积扩大，抗性增强。植株在20～24℃条件下生长的植株表现抗性最强，在30℃条件下生长的植株未表现抗性。没有过敏反应似乎就不会产生局部获得抗性（Costet *et al.*，1999）。

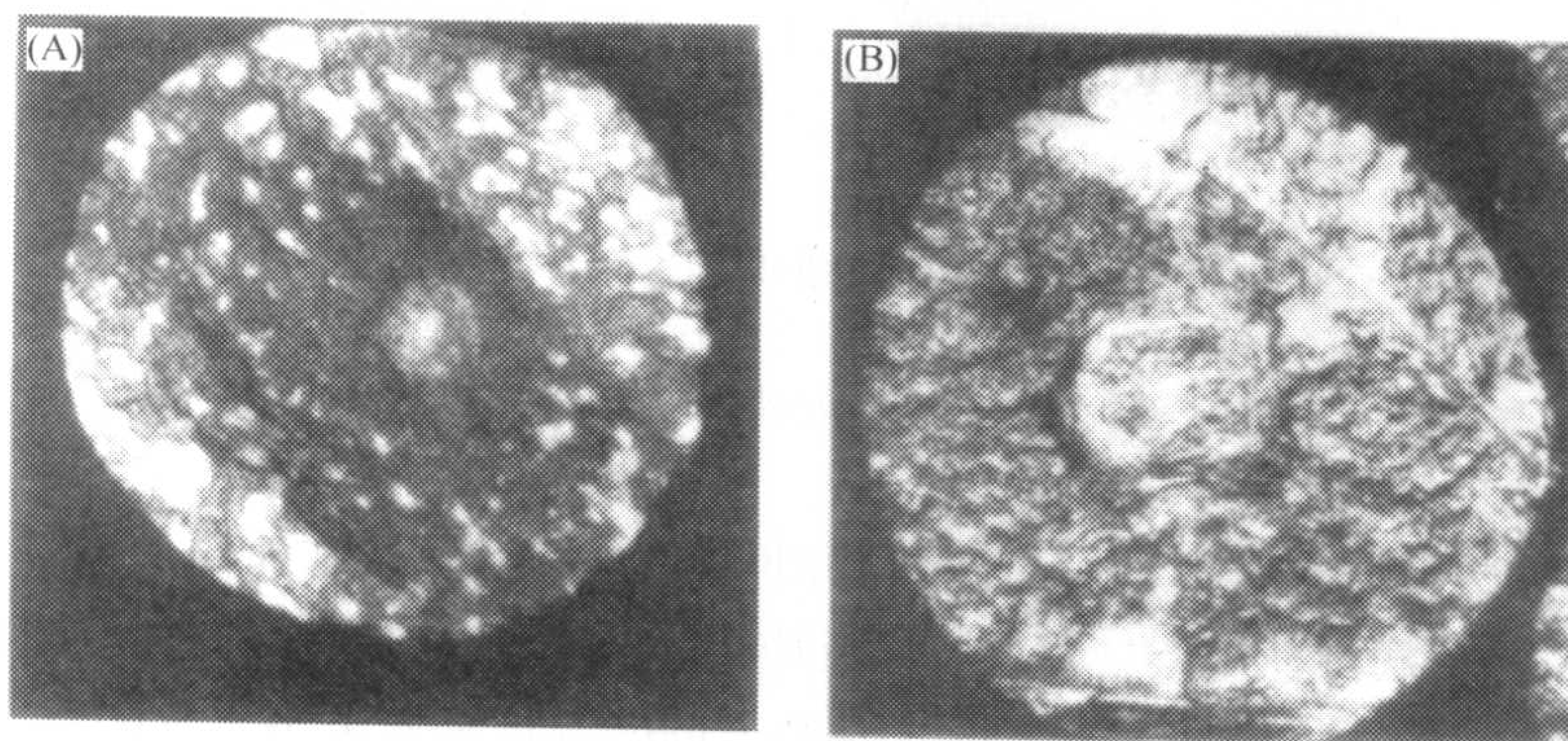


图10.6　对侵染的获得性抗性。（A）切自初次用TMV接种（中部的大枯斑）与7天后再次用浓缩的TMV接种体进行攻击接种的三生烟（Samsun NN）叶片的盘块。注意在原来枯斑附近第二次接种的区域没有枯斑出现。（B）以PVX作为接种体进行攻击接种的类似实验。没有出现无枯斑的区域。经惠允引自Ross(1961a)。

K. 系统获得性抗性（Ryals *et al.*，1996）

对系统获得抗性（systemic acquired resistance）的认识，最初主要来自Ross及其同事对TMV侵染烟草Samsun NN和TNV侵染Pinto菜豆的研究工作（Ross，1961b，1966）。在利用烟草进行的试验中，用TMV先接种下部叶片数天后，再次用TMV攻击接种相同或上部叶片（图10.7）。通过枯斑直径的缩小程度测定获得抗性（对某些病毒而言，枯斑数目减少）。在菜豆试验中，接种一片初生叶数天后，对对生的初生叶再进行攻击接种，枯斑大小是对照叶片的1/5～1/3，但和TMV侵染三生烟（Samsun NN）相比，枯斑数目没有减少。这种获得抗性在接种后2～3天可检测到，7天达到最高，能够持续20天左右，已具有获得抗性的叶片在挑战接种前是无病毒的。目前还未发现有完全抗性的出现，在30℃条件下生长的植株不产生诱导抗性，机械和化学损伤不能诱导获得抗性，由不能够产生局部坏死斑的病毒侵染时也不能诱导获得抗性。另

外，许多非特异性病原物侵染叶片时能够诱导出获得抗性（Gupta *et al*.，1974），在这类实验中许多条件都会影响枯斑的大小，因此，精确地研究诱导获得抗性是不大可能的。

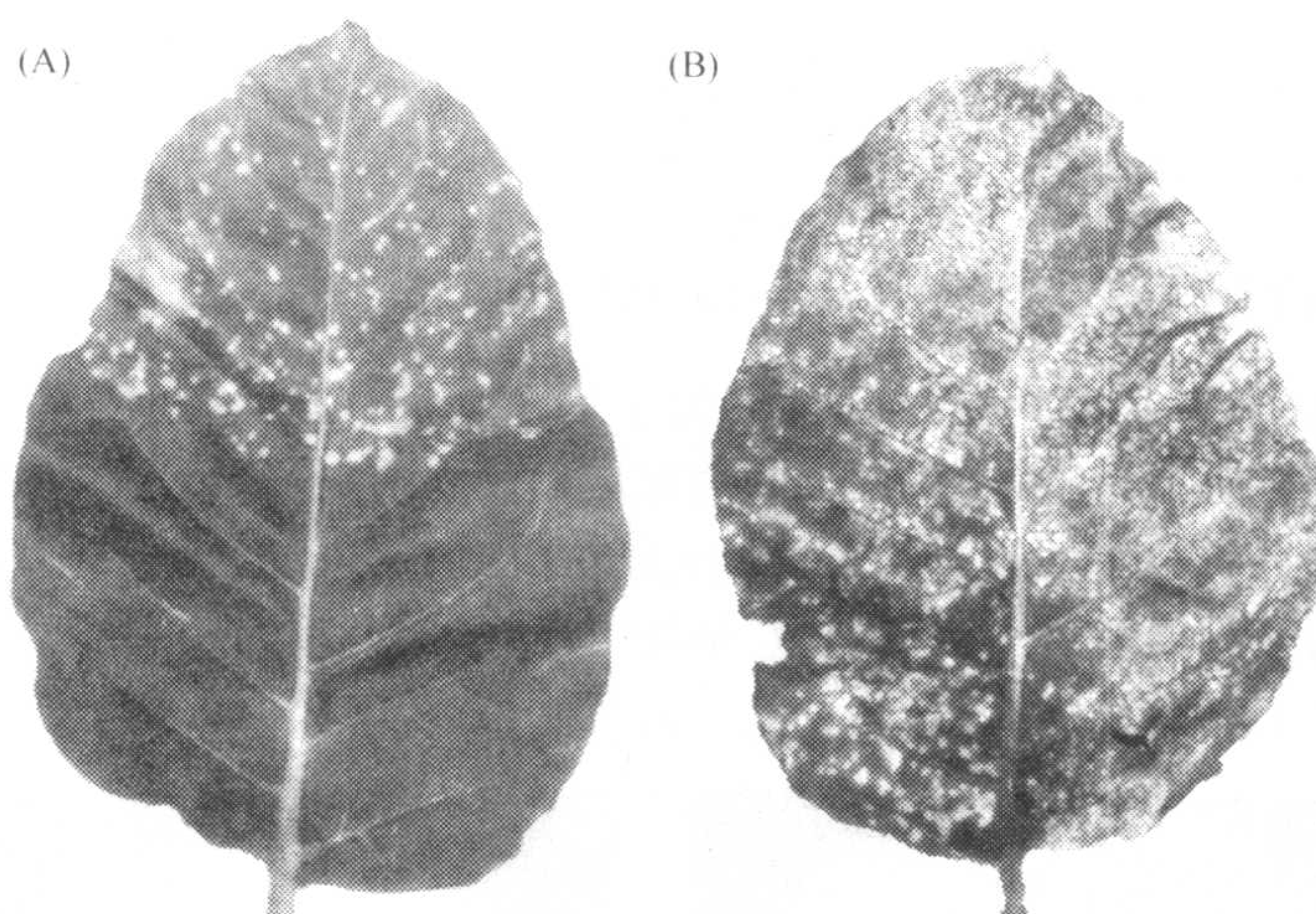


图 10.7 在距接种位点一定距离处的获得性抗性。(A) 初次用 TMV 接种的三生烟（Samsun NN）叶片的顶端半部，7 天后再次用 TMV 对整个叶片表面进行攻击接种。(B) 只进行第二次接种的对照叶片。经惠允引自 Ross（1961b）。

由 TMV 诱导的抗性对 TMV 是非特异性的，对 TNV 及其他病毒也具有抗性。在由其他各种寄主-病毒互作产生的过敏性反应中，也发现类似的由局部坏死斑诱导产生的非特异性获得抗性。但是，病毒特异性因子可能调控抗性范围（van Loon and Dijkstra，1976）。

Ross（1966）指出，影响枯斑数目的因素更多，产生较晚。他认为，枯斑数目的减少仅仅意味着在抗性较高的叶片中枯斑没有扩大到足以计数的程度。

1. 病程相关蛋白 [pathogenesis-related (PR) protein]（van Loon and van Strien，1999）

Gianinazzi 等（1970）和 van Loon 与 van Kammen（1970）研究表明，烟草叶片在 TMV 侵染后产生过敏性反应过程中，叶片中可溶性蛋白的组成发生了变化。被诱导产生的蛋白质被 Antoniw 等（1980）定名为病程相关蛋白或 PR 蛋白，此后得到广泛的研究，蛋白质的活性也得到鉴定（Shewry and Lucas，1998;，Dempsey *et al*.，1999）。PR 蛋白有 14 组（PR1～PR14）（表 10.4），分为两类，酸性和碱性 PR 蛋白。PR 蛋白在各类微生物（病毒、类病毒、细菌和真菌）侵染或用化学激发因子，如水杨酸（SA）和乙酰水杨酸（阿司匹林，aspirin）处理植物后诱导产生，在许多植物中已经得到鉴定（White，1979）。图 10.8 中泳道 4 的各种蛋白质是由一种不能在寄主中产生局部坏死枯斑的病毒诱导产生的 PR 蛋白。

表 10.4　PR 蛋白的类型

类型	生物学活性	抑制对象
1	未知	卵菌
2	β-1,3-葡聚糖酶	真菌
3	几丁质酶	真菌
4	结合几丁质	真菌
5	膜的透化	真菌

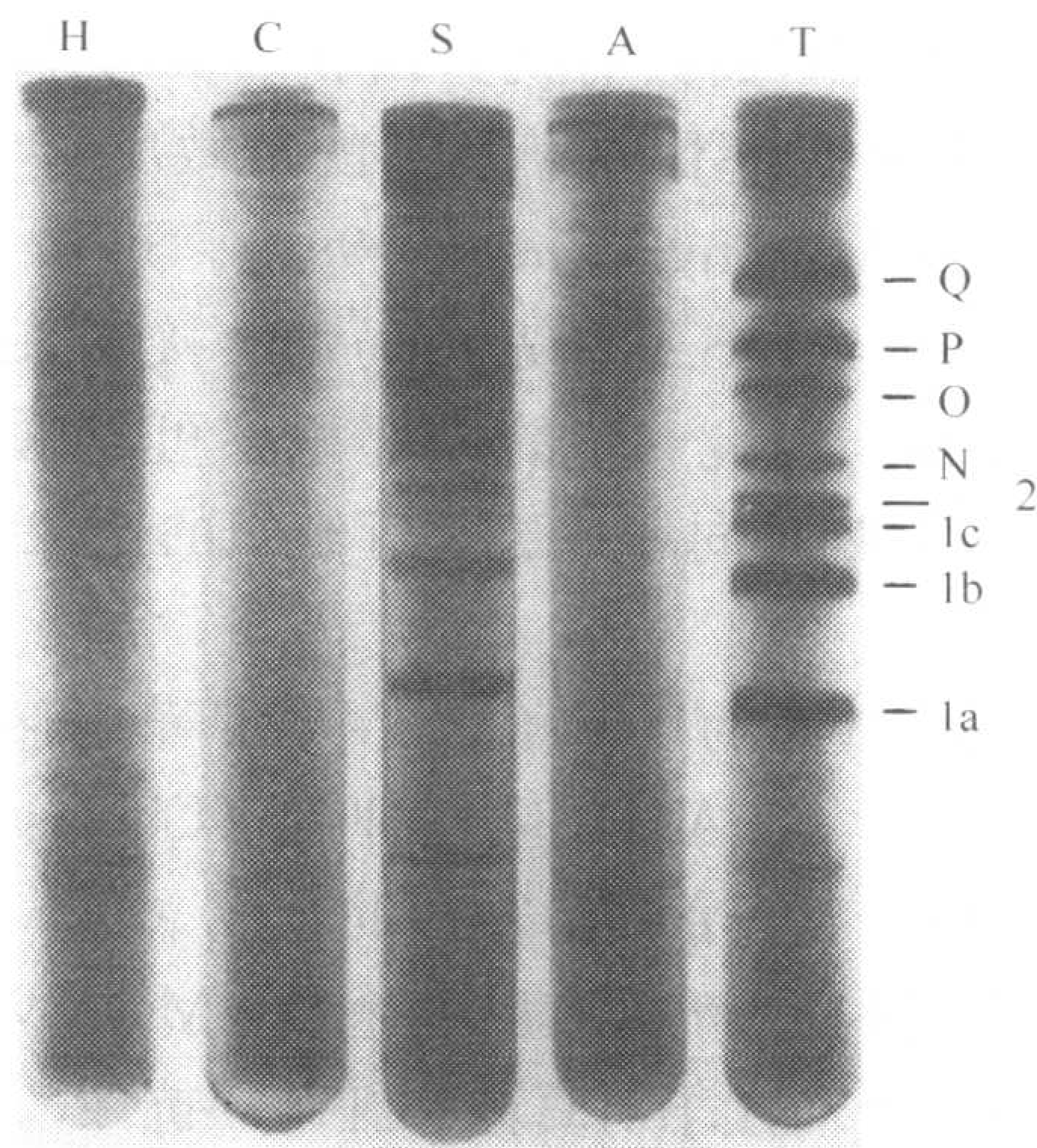


图 10.8　在进行各种处理后烟草的细胞间液中 PR 蛋白的积累情况。这些处理包括用水（H）、p-香豆酸（C）或水杨酸（S）喷洒，或用 AMV（A）或 TMV（T）接种植株。将细胞间液样品在非变性的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。主要 PR 蛋白的位置在右边注明。承蒙版权所有者（Blackwell Science Ltd.）的惠允，引自 Bol 和 van Kan（1988）。

过敏反应诱导的烟草基因的表达不同于 PR 蛋白的诱导表达，尤其是不同于对 PR 基因诱导因子，如水杨酸、甲基茉莉酸（methyl jasmonate）和乙烯利不敏感的 PR 蛋白（Hiraga *et al.*，2000）。

PR 蛋白在限制病毒扩散和获得抗性方面所起的作用还没有确定。事实上，如果某种或某些 PR 蛋白在抗病毒反应中起作用，将可能被发现。然而，当 PR 基因和 NN 重组在转基因烟草中大量表达时，单一的 PR 蛋白对 TMV 接种的坏死反应并没有影响（如基因 1b，Cutte *et al.*，1989；基因 1a 和 s，Linthorst *et al.*，1989）。

2. 水杨酸对病毒的影响

施用水杨酸抑制了 TMV 和 PVX 在接种组织中的复制（Chivasa *et al.*，1997；Naylor *et al.*，1998），水杨酸不仅降低病毒的积累，而且改变病毒基因组 RNA 与 mRNA 的比例。水杨酸还影响 AMV 在豇豆原生质体的复制，但对 AMV 在烟草叶片中的复制没有影响（Hooft van Huijsduijnen *et al.*，1986；Murphy *et al.*，1999）。

水杨酸似乎对 CMV 的复制没有影响，但对系统症状的产生有明显的延迟作用。这一结果表明，水杨酸影响病毒对脉管系统的侵入（Naylor *et al.*，1998）。水杨酸还影响 AMV 的长距离运输（Murphy *et al.*，1999）。因此，至少就 AMV 而言，水杨酸处理不同的寄主似乎有不同的效果。对于其他病毒，如 PVY，水杨酸似乎对病毒的侵染没有影响（Pennazio *et al.*，1985）。

3. 系统获得性抗性的路径

PR 蛋白受病毒侵染的诱导并与系统获得性抗性有关，其作用也相当明确，PR 蛋白似乎对病毒的抑制没有作用，而具有抗真菌和细菌的作用，但 PR 蛋白的特点仍然是个谜。但是，TMV 侵染含 *N* 基因烟草诱导的过敏反应与真菌和细菌侵染引起的过敏反应有很多共同特征（Murphy *et al.*，1999）。过敏反应是活性氧（reactive oxygen，ROS）的急剧产生所致，SA 首先在局部、接着在系统组织中积累。由于 SA 的产生能够诱导产热代谢，因此 SA 的局部积累可以通过热成像进行早期检测（Chaerle *et al.*，1999）。SA 对病毒向坏死斑邻近组织的定位和系统获得抗性的产生是必需的。

由 SA 诱导的对 TMV 和 PVX 的复制和 CMV 在烟草中移动的抗性可以通过水杨羟肟酸（salicylhydroxamic acid，SHAM）进行抑制（Chivasa *et al.*，1997；Naylor *et al.*，1998）。SHAM 不抑制 SA 诱导的 PR 蛋白的合成（Chivasa *et al.*，1997；Chivasa and Carr，1998），这表明 SA 诱导的抗性有两种途径（Murphy *et al.*，1999）（图 10.9）。一种途径是诱导 PR 蛋白的产生而赋予对真菌和细菌的抗性；另一种途径是诱导对病毒复制和移动的抗性。

SHAM 是植物体内线粒体电子传递途径中的选择性氧化酶（alternative oxidase，AOX）的选择性竞争抑制剂（Murphy *et al.*，1999）。存在对 SHAM 敏感的 SA 诱导和 AOX 潜在诱导两条路径，对于 *N* 基因烟草抗 TMV 的早期阶段起关键作用。但是并不说明所有的抗性和其他抗病毒机制在过敏反应中都起作用。

参与防卫反应的信号转导途径中的其他化学信号还有一氧化氮、MAP 激酶、茉莉酸和乙烯（Dempsey *et al.*，1999；Klessig *et al.*，2000；Zhang and Klessig 2000）。然而，已经公认的是，尽管防卫反应有许多共同特征，但不仅仅有一条途径。例如，过敏反应、TMV/N 基因和 TCV/HRT 基因的抗性是依赖 SA 的出现，而不受乙烯或茉莉酸的诱导，也不受突变的 NRP1 的诱导（Knoester *et al.*，1998；Murphy *et al.*，1999；Kachroo *et al.*，2000），而 NRP1 的突变是对抗其他病原物所必需的（Dong，1998；Shah *et al.*，1999）。

如第Ⅱ节 A 部分所述，对于无毒基因与 R 基因互作中的后续信号转导路径还理解的不够详尽。参与系统获得抗性信号转导的下游活动需要某个或某些物质的移位。Ross（1966）已提供很好的证据，诱导抗性物质的运输参与了信号转导。例如，当烟草上部叶片的主脉被切断后，距断口远侧的叶片抗性信号不会扩展。类似地，接种叶的叶柄被沸水处理部分杀死后，当叶片处于饱和状态时，却阻止了抗性向其他叶片的扩展。另有试验显示，在大量的烟草植株中，诱导抗性物质等量地向茎干上下运动。

与具有抗性的未受侵染叶片的抗性机制一样，可迁移物质的本质也是未知的。能够

迁移的诱导抗性物质可能包括 SA、乙烯、茉莉酸、一氧化氮，或者甚至包括小的多肽如系统素（systemin）（Howe and Ryan，1999）。抗性机制可能与坏死斑周围组织区带的抗性机制相同也可能不同。系统获得抗性可能受非坏死的局部病毒侵染的诱导（Roberts，1982）。若第二次（挑战）接种所用的病毒是系统移动的病毒，则系统获得抗性就不会有效（Pennazio and Roggero，1988）。

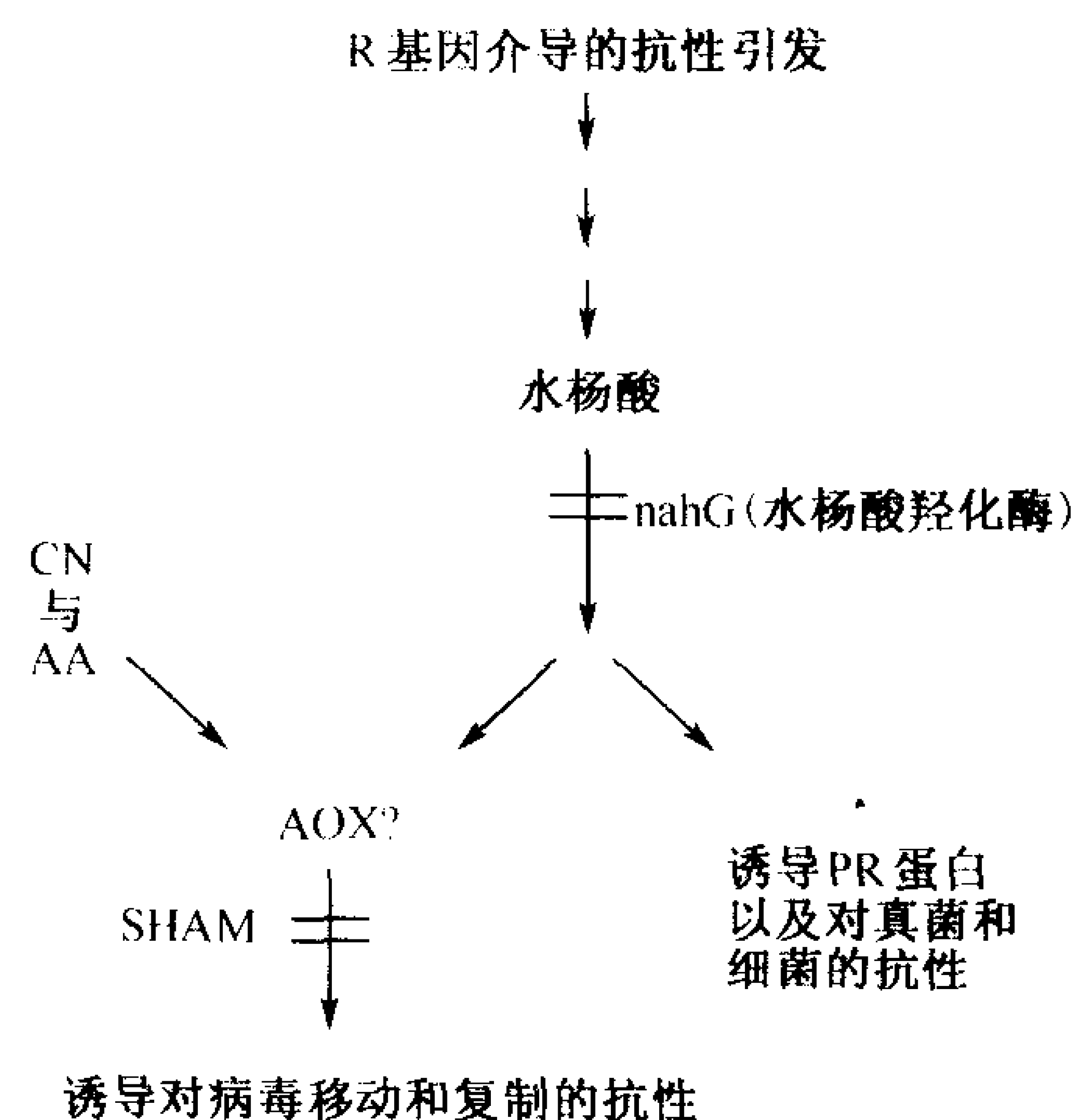


图 10.9 解释烟草中对病毒与其他病原的抗性诱发的一个可能模型。一种病原受到一个抗性（R）基因产物的识别，导致局部性细胞坏死与包括水杨酸（SA）作为其组分之一的防卫信号转导途径的激活。在防卫信号转导途径中，水杨酸之后的步骤在表达 SA 水解酶（细菌的 *nahG* 基因产物）的转基因植株中被阻断。在 SA 的下游，防卫信号转导途径看来发生了分化。一个分支（右）导致细胞外病程相关（PR）蛋白的诱发以及对细菌和真菌的系统性获得抗性（SAR）。另一个分支（左）导致对病毒的复制或长距离移动抗性的诱发。病毒专化性分支独立于另一分支，可受到氰化物（CN⁻）与抗霉素（actinomycin）A（AA）的激活，或受到水杨异羟肟酸（salicylhydroxamic acid，SHAM）的抑制。这些观察结果导致了假说的提出：氧化酶旁路活性（AOX）在诱发对病毒的 SAR 中起着某种作用。该假说与研究结果一致，即 AOX 蛋白与转录体的水平在表达 SAR 的烟草组织中升高。承蒙版权所有者（© Elsevier Science）惠允，引自 Murphy 等（1999）。

L. 对伤害的反应

伤口包括机械损伤、昆虫和包括病毒在内的各种病原物侵染造成的坏死，通常在植物体内导致一系列的伤害反应。这些反应需有许多寄主编码的蛋白质的非特异性诱导的参与，最复杂的反应是受伤的周皮和细胞壁的变化，包括木质化、木栓化和胼胝体的沉淀，病毒诱导的坏死可能导致伤害反应。在 TMV 的 VM 株系侵染菜豆后产生很小坏死斑的幼嫩叶片上能够形成周皮，但在老叶片或 U1 株系侵染后产生大的坏死斑的叶片上不能形成（Wu，1973）。

已有诸多研究报道，局部坏死枯斑周围细胞中胼胝体的沉淀将导致细胞壁的增厚，可能会堵塞胞间连丝（Hiruki and Tu，1972；Wu，1973）。Stobbs 等（1977）对 TMV 侵染的 pinto 菜豆的研究发现，胼胝质在活细胞中的沉淀量超过了病毒可检测到的界限，但仍然局限于荧光代谢物积累区。Kimmins 和 Brown（1973）测定了被侵染叶片提取物中的细胞壁糖蛋白，发现 TMV 或 TNV 接种过敏性寄主后有糖蛋白的积累，在对照接种的叶片中也有类似的反应发生。

其他研究表明，细胞壁的修饰可能不是限制病毒移动的因素。Appiano 等（1977）认为，TBSV 侵染千日红（*Gomphrena*）诱发的坏死斑中细胞壁的木质化没有阻碍病毒的扩散，因为木质化不是发生在整个细胞的周边，并且在细胞壁被修饰的细胞中也能够检测到病毒。

伤害反应可能存在几条系统信号途径（Rhodes *et al.*，1999），但近期的研究表明，SAR 和伤害反应途径可能不是完全独立的（Maleck and Dietrich，1999）。

M. 抗病毒因子

带有 *N* 基因烟草品种的坏死反应与一种具有抗病毒特性的蛋白质相关，这种蛋白质被命名为“病毒复制抑制剂”（inhibitor of virus replication，IVR）（Loebenstein and Gera，1981；Loebenstein *et al.*，1990）。从烟草 Samsun NN 原生质体内释放到介质中的 IVR，不仅抑制了 TMV 在局部枯斑烟草品种原生质体中的复制，也抑制了 TMV 在系统侵染烟草品种原生质体中的复制。一种具有抗病毒特性的 23 kDa 蛋白质已经从提取物中得到纯化（Gera *et al.*，1990），可被 IVR 抗血清识别的一种蛋白质的 cDNA 也已经纯化和克隆（Akad *et al.*，1999）。因此有人提出，*N* 基因产物可作为一种信号诱导 IVR 样的蛋白质，或者 IVR 与 PR 蛋白类似（Loebenstein *et al.*，1990；Akad *et al.*，1999）。

Sela 及其同事已经从含 *N* 基因的烟草属（*Nicotiana*）植物培养物中初步纯化和鉴定了一些“抗病毒因子”（antiviral factor，AVF）(Fraser，1987a)。在 AVF 和人类干扰素间已经划清界限（Sela *et al.*，1987；Edelbaum *et al.*，1990）。然而，涉及寄主抗性以及上述 AVF 和 IVR 之间关系的研究工作还有待进一步加强。

N. 病毒越过各种障碍的扩散能力

病毒具有越过各种组织阻碍到达接种叶片筛分子，扩散到维管系统和退出光合产物库的能力，控制这些能力的因子已经在第 9 章第Ⅱ节（E1 和 G 部分）进行了讨论。

一种不同于基因对基因模式（参见第 16 章第Ⅴ节 B.1）的抗性模式以拟南芥（*Arabidopsis*）的 *RTM1* 基因为代表（Chisholm *et al.*，2000）。*RTM1* 基因是限制 TEV 长距离运输避免引起过敏反应或系统获得抗性所必需的，基因产物与来自波罗蜜（*Artocarpus integrifolia*）的植物凝集素（lectin）　波罗蜜凝集素（jacalin）的 α 链相似，它属于与抵御昆虫和真菌相关的蛋白质家族成员。

O. 系统寄主反应

如第 3 章第Ⅱ节 B 部分所述，病毒诱导的系统症状变化较大，最为共同与典型的症状是花叶。花叶症状是由显示不同程度的褪绿区和保持绿色的绿岛区组成，由深绿、嫩绿及褪绿斑形成的花叶从相对较大的花叶（如 TMV、TYMV 和 AbMV）到小的致密的花叶症状之间的变化（如豇豆中的 CPMV，烟草中的 AMV）。在单子叶植物中花叶的面积通常被叶片的叶脉所限而形成线条或条点，花叶症状的扩展在第 9 章（参见第Ⅳ节 D 部分）中有更详尽的叙述。研究花叶症状有两种方法：一种是对病毒基因组的突变研究；另一种是对侵染叶片进行电镜检测。TMV 和 TYMV 是基因组研究最多的病毒，其他病毒基因组的信息也积累的越来越多。

1. 褪绿（chlorosis）

多数花叶症状都有不同程度的褪绿区，褪绿程度从几乎全白到淡绿。很明显，褪绿反应是病毒对叶绿体直接或间接影响的结果，病毒侵染后，破坏叶绿体的结构并影响其功能，造成叶绿素的减少。

a. TYMV 和 TMV

有关病毒的侵染尤其 TYMV 对叶绿体细胞学结构的影响，在第 9 章（第Ⅲ节 K.3 和第Ⅳ节 C 部分）有详细阐述。要理解病毒对所造成的花叶褪绿因子的影响，了解病毒侵染时叶片的发育阶段和病毒在不同褪绿区变异的可能性是很重要的。如果几乎充分成熟的叶片受到侵染，则褪绿是由于成熟叶绿体受到破坏而造成的。当幼嫩叶片被系统侵染时，病毒可能影响叶绿体的发育。

有些情况下如 TMV 侵染烟草，同一病毒株系在不同植株间引起的发病程度存在很大的差异。然而，多年来人们已知在花叶组织的金黄色斑块中偶尔也会有不同的病毒株系存在。这些株系可能是由野生型突变而来，在叶片的发育过程中将野生株系逐出在外。在 TYMV 侵染的大白菜上有许多颜色深浅不同的斑块，从这些斑块中能够分离到不同的病毒株系（Chalcroft and Matthews，1967a，1967b）。

TMV 外壳蛋白的删除和特异氨基酸替换都能影响褪绿症状的产生（Dawson *et al.*，1988）。仅保留外壳蛋白 C 端的 TMV 突变株系在烟草（Dawson *et al.*，1988）及叶片伸长和扩展过程中都引起的严重的褪绿症状（Lindbeck *et al.*，1991；1992）。褪绿症状与 TMV 外壳蛋白形成聚集体的含量有关，外壳蛋白聚集体仅在侵染细胞内聚集，但不在叶绿体内积累。与此相反，有人发现 TMV-U1 株系褪绿自然突变体 YSI/1 外壳蛋白出现在与类囊体膜相连的叶绿体中（Banerjee *et al.*，1995）。Reinero 和 Beachy（1986）在侵染细胞叶绿体的基质和膜片中都检测到 TMV 外壳蛋白。YSI/1 与 U1 株系的外壳蛋白仅存在两个核苷酸的差异，其中一个是在 19 氨基酸位点由 Asp 突变成 Val，影响褪绿表型（Banerjee *et al.*，1995）；另一个褪绿自然突变也是在外壳蛋白氨基酸 19 位点发生氨基酸的替换，由 Asp 变成 Ala（Wittmann *et al.*，1965）。但是，TMV 侵染时严重褪绿症状比较少见，一般仅在突变体侵染时出现。在野生型 TMV 侵染时，花叶组织的褪绿通常是嫩绿，并不伴随外壳蛋白或外壳蛋白在叶绿体内的积累。

b. CMV

褪绿是 CMV 的株系特异症状，CMV-M 和 CMV-Y 株系侵染烟草时造成严重的系统褪绿。在 CMV-M 和一新的花叶株系 CMV-Fny 间的假重组位于负责编码 CMV-M 的 RNA 3 的基因上，由 cDNA 转录的重组 RNA 3 试验表明，在烟草中的发病症状是由外壳蛋白基因决定的（Shintaku and Palukaitis，1990）。症状决定子进一步定位于外壳蛋白 129 位氨基酸下游（Shintaku *et al.*，1992），表明局部的二级结构影响症状类型。CMV-Y 接种烟草叶片引起的严重褪绿斑也与外壳蛋白 129 位氨基酸以及寄主核编码的隐性基因有关（Takahashi and Ehara，1993）。在 CMV-Y 和新的花叶株系 CMV-O 的突变试验中，Suzuki 等（1995）的研究表明，外壳蛋白 129 位氨基酸不仅参与褪绿症状的产生而且参与严重叶脉坏死和局部坏死枯斑的形成（表 10.5）。他们推断症状的产生与外壳蛋白分子的三级结构和 129 位氨基酸周围的局部二级结构有关。

表 10.5　CMV 的外壳蛋白参与症状的产生

接种物[a]	碱基		氨基酸		烟草植株上的症状
	位置[b]	变化	位置	置换	
A. 外壳蛋白突变体小结					
Y3		无		无	褪绿
O3		无		无	绿花叶
Y (SP)	1644	U 变为 C		Ser 变为 Pro	绿花叶
O (PS)	1645	C 变为 U		Pro 变为 Ser	褪绿
Y (SL)	1644, 1645	UC 变为 CU		Ser 变为 Leu	NLL, 脉坏死
O (PL)	1646	C 变为 U		Pro 变为 Leu	NLL, 脉坏死
Y (SF)	1645	C 变为 U		Ser 变为 Phe	NLL
O (PF)	1645, 1646	CC 变为 UU		Pro 变为 Phe	NLL
Y (SG)	1645, 1646	UCU 变为 GGC		Ser 变为 Gly	绿花叶
B. Y (SF) 回复体 (revertant) 小结					
Y (SF)		无		无	NLL
Y (SF) R1	1645	U 变为 C	129	Phe 变为 Ser	褪绿
Y (SF) R2	1698	G 变为 U	147	Ala 变为 Ser	褪绿
Y (SF) R3	1698	G 变为 U	147	Ala 变为 Ser	褪绿
Y (SF) R4	1690	C 变为 A	144	Ala 变为 Glu	绿花叶
Y (SF) R5	1672	C 变为 A	138	Ala 变为 Asp	轻微脉坏死

注：a. 名称指来自野生型和突变体 RNA 3 cDNA 的转录物；每个转录物都与来自 CMV-Y RNA 1 和 CMV-Y RNA 2 的 cDNA 的转录物一起接种；b. 改变碱基的核苷酸号（CMV-Y 参见 Nitta *et al.*, 1988；CMV-O，Hayakawa *et al.*, 1989）；NLL，接种叶片上的局部坏死斑。承蒙惠允，引自 Suzuki 等（1995）。

c. CaMV

研究 CaMV 症状决定子主要有病毒基因组侵染植物和病毒基因转化植物两种方法。两种方法都鉴定出诱导褪绿症状的主要决定因子是编码 P6 蛋白的基因Ⅵ。Stratford 和 Covey（1989）构建了在芜菁（*Brassica rapa*）上引起严重症状的 Cabb B-JI 株系与引起温和症状的 Bari-1 株系间的一系列杂交株系。叶片褪绿程度决定子位于组成基因Ⅵ的部分区和基因Ⅵ与基因Ⅶ间 6103～6190 核苷酸的基因间区。

用表达含有基因Ⅵ的 CaMV 的 DNA 片段转化烟草后，转基因植株表现出了类似病毒病的症状（Baughman *et al.*, 1988；Balazs，1990；Goldberg *et al.*，1991）。来自不同分离物的基因Ⅵ产生不同的症状，或产生类似花叶症状或出现白化叶，基因Ⅵ敲除或移码突变都能抑制症状产生。免疫印迹试验表明，症状的产生与叶片中 66 kDa 基因产物的出现密切相关。但是，他们测定转基因烟草植株中 66 kDa 蛋白质的含量仅为受侵染芜菁中的 1/20。而且，烟草不是 CaMV 的寄主，所转的基因是来自不能在侵染烟草中引起症状的 FMV(Goldberg *et al.*，1991）的基因Ⅵ，这一事实增加了非寄主影响的可能性。为进一步验证，Cecchini 等（1997a）构建了拟南芥转基因系，表达来自 CaMV 分离物 Cabb B-JI、Bari-1 和重组体 Baji-31 的基因Ⅵ序列，其中重组体 Baji-31 在拟南芥中造成严重的侵染（Cecchini *et al.*，1997b）。寄主植物表达的基因Ⅵ产生的症状特点

是由 P6 的表达水平和 P6 序列本身决定的。差异显示 PCR 表明，与未受侵染的植株相比，转 P6 基因品种和 CaMV 侵染的拟南芥中 mRNA 种类的富余量变化是相似的（Geri *et al.*，1999）。在转基因和病毒侵染的植株中含量下降的 mRNA 种类包括酚类似物磺基转移酶（sulfotransferase）和富含甘氨酸 RNA 结合蛋白，含量增加的 mRNA 种类有 myb 蛋白和胁迫诱导蛋白。

对 CaMV 和拟南芥互作的进一步研究中，Cecchini 等（1998）用 30 个 CaMV 分离物接种拟南芥 Col-O *gl1* 生态型，其中 13 个分离物未引起症状，其余的分别引起从轻微到非常严重等不同程度的症状，有些症状明显不同于芜菁分离物产生的症状。由不同 CaMV 分离物在单一拟南芥生态型中引起的症状变化多于单一 CaMV 分离物在不同拟南芥生态型中引起的症状变化。CaMV 侵染 EMS 诱变的拟南芥突变体（Col-O *dv1*）产生其他的症状，包括非典型的坏死反应。随着对拟南芥基因组的分子水平的理解，应能揭示出参与互作、导致症状产生的植物基因（Schenk *et al.*，2000）。CaMV 分离物 W260 克服拟南芥生态型 Tsu-O 的抗性的能力与 ORF Ⅵ相关（Leisner *et al.*，2001）。

d. MSV

免疫组织化学和原位杂交技术已经应用于 MSV 在侵染玉米植株的定位（Lucy *et al.*，1996）。病毒不侵染顶端分生组织，仅出现在叶片中显示典型褪绿条斑症状的区域。MSV 不同株系引起的条斑宽度和褪绿程度存在差异。Ns 株系比 Nm 株系产生的早期症状条斑宽，褪绿明显（Boulton *et al.*，1991a），Ns 也有着更广的寄主范围。定点诱变与嵌合病毒的构建结果显示基因组第 40 位核苷酸影响条斑宽度，第 2473 位核苷酸决定褪绿程度和条斑的长度（表 10.6）。第 40 位核苷酸位于控制细胞间运动的基因Ⅵ内，第 2473 位核苷酸位于大的基因间区，该核苷酸的变化改变了 *C1* 基因起始密码子上游 101 位核苷酸处的潜在启动子序列。－101 位核苷酸下游其他数个启动子的诱变结果表明，－101 启动子单独即可决定褪绿、条斑长度、潜伏期和寄主范围（Boulton *et al.*，1991b）。

2. 脉明

引起花叶的病毒侵染早期产生的系统症状是脉明，脉明在第一波（批）病毒到达幼嫩叶片时即可暂时发生。Dawson 及其同事一直致力于解释这一现象（Dawson，1999）。TMV 侵染后温度若在 25℃以上产生脉明，在 40℃以下随温度升高脉明程度增强。脉明的发生还取决于光照，合适光照条件达到后 5min 内即会发生脉明，早于多数病毒在叶片中的复制，因此与叶绿体的异常没有关系。由此得出结论，脉明是一种光学幻觉（optical illusion）。

3. 镶脉

病毒侵染除产生褪绿及黄绿和深绿的区域外，一些引起花叶的病毒还导致产生典型的褪绿脉带（镶脉），CaMV 的许多株系尤为典型。Al-Kaff 和 Covey（1996）在研究 CaMV 的分布时发现，在系统侵染的扩展叶片上，沿叶脉带区域的病毒比脉间区多，但在较幼嫩的系统侵染叶上，褪绿叶脉边缘的病毒少于脉间区绿岛。

表 10.6　MSV 野生型和突变体的基因组在受侵染的玉米植株中的致病性特征

病毒或杂种	显症（接种后天数）[b]	条斑形态[d]	褪绿[e]	病毒 DNA 浓度[f]	寄主范围[g]
实验 1 和 2					
MSV-Nm[a]	9	N、S	轻微	33	R
MSV-Ns	6	W、L	严重	100	B
MSV-Nm(s40)	9	W、S	轻微	76	R
MSV-Nm(s2473)	6	N、L	严重	95	B
MSV-Nm(s40，2473)	6	W、L	严重	108	B
实验 3 和 4					
MSV-Nm	8	N、S	轻微	ND	R
MSV-Ns	6	W、L	严重	ND	B
MSV-Nm(TATA，101)	6[c]	N、L	严重	ND	ND
MSV-Ns(TATA，101)	6	W、L	严重	ND	B

注：a. MSV-Ns，MSV 尼日利亚株系诱发宽、长、严重的褪绿条斑；MSV-Nm，MSV-Ns 的变株，诱发狭窄、断续、轻微的褪绿条斑；（s40）和（s2473），置换分别位于核苷酸 40 和 2473；（TATA，101），在核苷酸 −57 和 62处 TATA 序列变成了 GATA 和 TACA。

b. 接种之后显症的最早日期（每一种构建物用农杆菌接种法至少接种 50 株）。

c. 在实验 1 中，接种 8 天后症状最先出现在 MSV-Nm（TATA，101）侵染的植株上。

d. N，窄（narrow）；W，宽（wide）；L，长（long）；S，短（short）。

e. 视觉估计条斑褪绿的程度。

f. 相对浓度，相对于 MSV-Ns 侵染组织 = 100 时的百分比；来自两个实验的平均值。

g. B，寄主范围宽（broad）；R，寄主范围较窄（restricted）；ND，未定（not determined）。承蒙惠允，引自 Boulton 等（1991b）

4．绿岛

花叶类型的绿岛就被测样品而言在细胞学和生化上是正常的，多数情况下，如烟草花叶病毒属病毒（tobamoviruses）（Atkinson and Matthews，1970）、黄瓜花叶病毒属病毒（cucumoviruses）(Loebenstein *et al.*，1977)、马铃薯 Y 病毒属病毒（potyviruses）(Suzuki *et al.*，1989)，侵染性病毒的含量很低或没有，病毒蛋白或 dsRNA 也检测不到。产生绿岛又恢复正常后的植株约 50%是无毒的（Murakishi and Carlson，1976）。但 CaMV 侵染的植株，绿岛中有大量病毒的积累（Al-Kaff and Covey，1996）。在 CaMV 侵染的芜菁发展成为绿岛的一些脉间区，病毒含量较高。

Atkinson 和 Matthews（1970）对 TMV 侵染烟草形成的绿岛进行了详细研究，将绿岛区分为两种类型："真绿岛"，在叶片终生都保持深绿色；"假绿岛"，在叶片发育的后期阶段有病毒产物的出现。假绿岛边缘模糊而真绿岛边缘清晰。研究者对褪绿边缘两侧细胞内病毒含量做了精确分析（图 9.21），褪绿细胞含有大量的结晶状 TMV内含体，而绿岛细胞内没有任何内含体的存在。在接近边缘的绿岛细胞内观测到 TMV 病毒粒体，但离边缘越远病毒粒体数目越少，到绿岛中心则不含有病毒粒体。

几种证据表明，绿岛对同一病毒或关系相近的病毒的重复侵染具有抗性（Chalcroft

and Matthews, 1967a, b; Atkinson and Matthews, 1970; Loebenstein *et al.*, 1977)。

影响绿岛占叶片面积比例大小的因素很多，包括叶龄、病毒株系、季节、植株下部叶片的去除（Crosbie and Matthews, 1974b）。在叶片的无毒状态下绿岛不能持久性存在。引起病毒骤然复制通常发生在形成假绿岛后的数周和气温的突然升高（Atkinson and Matthews, 1970; Matthews, 1973; Loebenstein *et al.*, 1977）。

绿岛可能是植物病毒侵染后产生的更为普遍的现象之一。在 TYMV 侵染大白菜产生的局部坏死斑内，部分细胞内没有被病毒侵染的迹象，即使相邻细胞全部被侵染仍能在相当长的时间内保持无病毒状态，这些细胞可能像花叶中绿岛内存在的细胞一样处于抗性状态。可能在所有受侵染叶片中部分细胞变得具有抗性，但仅有仍然保持潜在分裂能力的细胞能够引起或大或小的绿岛。绿岛也可能出现在寄主防御机制未激活之前病毒进入叶片的区域。

P. 花叶的发展

花叶症状的结构在第 9 章第Ⅳ节 D 部分已有详述，对花叶的发展已经提出各种假说。如前所述，病毒被系统性地运输到库叶（sink leaf）中，花叶仅在库叶上发展并在病毒系统侵入时或侵入后症状最明显。

如在本书第 3 版（Matthews, 1991）写作期间，有人认为花叶图（型）式是在茎（苗）端（shoot apex）确定的。据推测在被多种病毒株系混合侵染的叶片中，第一个进入正在分裂的细胞的病毒粒体先占领该细胞和所有（或几乎所有）的子代细胞，在成熟叶片中产生或大或小的岛组织，岛组织被初侵染的病毒株系所占领。支持这一假说的主要事实如下：

- TMV 和 TYMV 引起的花叶在处于扩展期时被病毒侵入的叶片中最明显，如 TMV 侵染的烟草叶片长不到 1.5 cm。
- 组成花叶的变色斑点大小呈梯度变化，叶片越幼嫩岛就越大。
- 在某些情况下，叶片一半是深绿色，另一半呈淡绿或褪绿。
- 精确测定显示微小花叶内细胞的受病毒侵染的程度不同。不同平面层的叶肉细胞由病毒造成的叶绿体的破坏类型不同。

但是，也有几种不支持这一假说的情况：

(1) 仅有某些病毒到达分生组织区（参见第 9 章第Ⅱ节 J.8），病毒在分生组织区细胞分裂期侵染处于分裂期的细胞。

(2) 与光同化物从源到库的转移相伴随的病毒长距离运输的最新研究（参见第 9 章第Ⅱ节 G）表明，系统移动的病毒从远离分生组织区的维管系统卸下，必须通过细胞间运动才能到达正处于细胞分裂状态的叶原基。

(3) 近期有关细胞间通讯的研究显示，在共质体内信息传递畅通而在共质体外不能有效地传递。

(4) 人们日益深刻地认识到，在病毒侵染过程中寄主基因沉默防御系统（第Ⅳ节 A）起着非常重要的作用，Ratcliff 等（1997）认为绿岛可能是基因沉默的结果。

因此，对花叶症状最新的理解为，参与花叶症状形成的复杂因子主要有病毒的系统和局部移动、病毒侵入分生组织的能力、病毒株系及其突变倾向，以及可能最重要的一

点是病毒侵入与寄主防御反应之间的冲突。不同的病毒和寄主组合，在花叶症状发展过程中症状形成因子和其他因素间的平衡度可能存在差异。

Q. 症状严重度

不同的病毒分离物或株系在一种花叶症状形成因子组合中产生的花叶症状严重度有所不同。其中一些因子在对褪绿的讨论（第Ⅱ节O.1）中已有介绍，这些因子都来自病毒和寄主。例如，Martin等（1997）检测了拟南芥116种生态型对接种YoMV的反应，基于矮化、花异常或种子形态和植株死亡定义了5组症状。Lee等（1996）在拟南芥中鉴定出一个对TRSV有耐性的基因位点*TTR1*。

在有些情况下，病毒的基因不同产生的症状严重度也不同。例如，两个几乎不产生症状的TMV突变体和亲本病毒株系的核苷酸序列比对显示，参与抑制症状产生的126 kDa和183 kDa蛋白质的第348位氨基酸由Cys变成Tyr。两种蛋白质中另外两个氨基酸的变化也可能影响了症状的表达（Nishiguchi *et al*.，1985）。TMV的*Holmes' masked*（M）株系和U1株系的不同症状决定子已经定位于126/183 kDa蛋白质的N端区域（Shintaku *et al*.，1996）。两个株系中非保守域的8个核苷酸中单个或多个核苷酸替换都会改变症状表现，但并不总是诱发互补的可见症状。在某些情况下，另一位点的自然突变也会影响症状表型。系统症状的严重度与病毒的积累量没有相关联系。

CMV和TAV间假重组和重组鉴定出3′端RNA 3的3′端（编码外壳蛋白）是症状严重度的主要决定子（Salánki *et al*.，1997）。TAV的RNA 1和RNA 2与CMV的RNA 3的组合对本生烟（*N. benthamiana*）产生的症状比两个亲本或其他假重组体都要严重。另外，CMV亚组Ⅰ株系的RNA 2与番茄的症状严重度有关（Hellwald *et al*.，2000）。

越来越多的研究利用转基因植物表达病毒基因来探讨症状表达。例如，Ghorbel等（2001）提出CTV的p23在墨西哥酸橙（*Mexican lime*）中参与某些症状的表达。但是，转基因表达并不一定能鉴定出真正的症状决定子。

并非所有的严重度决定子都是蛋白质。TVMV的3′非编码区决定普通烟（*N. tabacum*）的症状严重度（Rodriguez-Cerezo *et al*.，1991a）。

然而，对多数病毒来讲，是病毒的不同基因（及非编码区）联合决定着症状的严重度。Stratford和Covey（1988）在CaMV的各种基因对芜菁的发病症状影响的研究中，检测到影响病状发展的不同基因位点（图10.10）。植物矮化受到至少两个独立的位点影响，一个含有基因Ⅰ和基因Ⅱ的部分片段，另一个在逆转录酶基因（基因Ⅴ）内。同样，基因Ⅵ影响褪绿（参见第Ⅱ节O.1.c）。因此，发病过程中的不同方面分别由病毒基因组的特异部分决定，病毒基因组的大部分都参与其中。

由RNA病毒多个基因决定症状的例子是用CymRSV和CIRV的杂种病毒所做的实验。Burgyan等（2000）证明在本生烟的坏死反应与ORF 1(p35)和p19的产物相关。

由于植物呼肠病毒属的成员不能通过单斑分离的方法获得，因此突变体也就很难分离到。然而，Kimura等（1987）将稀释的RDV模式株系（O株系）接种液注射到昆虫介体，然后饲喂水稻，对表现严重症状的水稻植株进行重复选择，获得了RDV严重株系（S）(图10.11)。S株系基因组中片段4的分子质量明显比O株系的高出20 kDa，而O株系中相对应的基因产物相对分子质量（M_r）为43 kDa，而S株系中M_r为44 kDa。

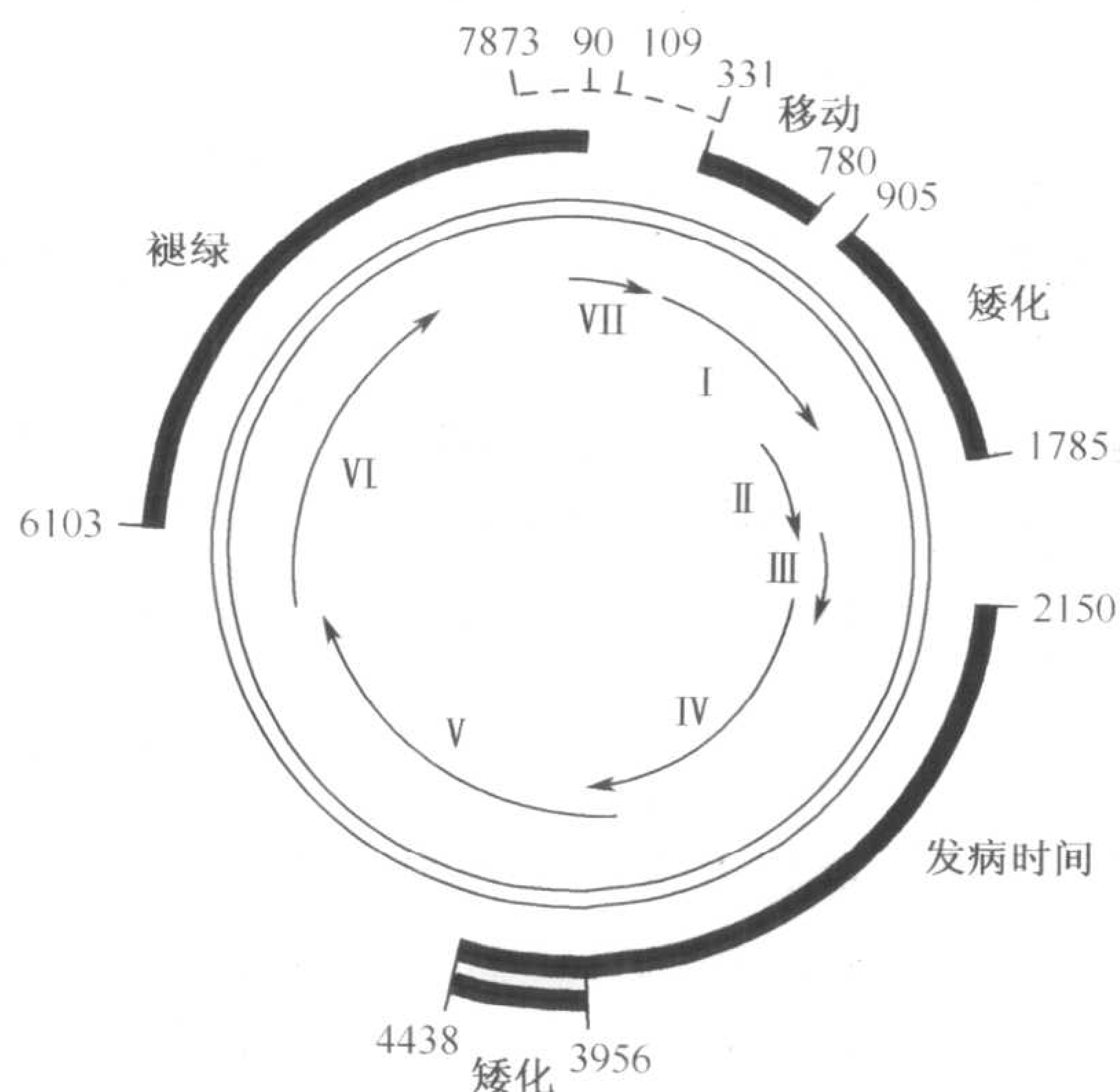


图 10.10　CaMV 基因组中含有株系专化性症状决定子的区域的位置。标有罗马数字的箭头代表病毒基因。在 CaMV 不同株系（Cabb B-JI 和 Bari 1）侵染时包含参与决定不同症状特征的序列域均已标出：扩展，在较幼小叶片上脉明症状扩展的速率；矮化，整株矮化；时间，在接种与脉明症状最初出现之间的时间段；褪绿，叶片中叶绿素含量的变化。虚线代表可能含有影响矮化和时间（第 7873～109 位核苷酸）以及症状扩展（第 109～331 位核苷酸）的位点，但其专化性作用尚未确定。承蒙惠允，引自 Stratford 和 Covey(1989)。



图10.11　水稻矮缩病毒(RDV)侵染水稻后对水稻植株的矮化作用。右边为健康植株。受到标准株系(O)和严重症状突变体(S)侵染的植株分别位于中间和左边。承蒙惠允，引自 Kimura 等(1987)。

此蛋白质位于病毒的外层衣壳中。研究发现呼肠病毒对侵染的小白鼠的神经毒力作用是由外层衣壳蛋白控制的，这一事实支持了片段 4 的基因产物有助于产生更为严重的症状的观点（Weiner *et al.*，1977）。

我们必须区分开症状严重度（symptom severity）和症状表型（symptom phenotype）。例如，菜豆金色花叶病毒属成员 TGMV 的普通株系在本生烟上引起广泛的褪绿症状，而黄化株系在系统侵染的叶片上产生脉褪绿症状。这两个株系在曼陀罗（*Datura stramonium*）上引起的症状也不相同。这两个株系引起的表型表达的差异是由编码移动蛋白的基因的 3′端的一个核苷酸所决定的（Saunders *et al.*，2001a）。

R. 症状恢复

有些病毒侵染的植物在系统症状出现后又有明显恢复的现象，其中线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）（Wingard，1928；Lister and Murant，1967）、烟草脆裂病毒属病毒（tobraviruses）（Cadman and Harrison，1959）和花椰菜花叶病毒属病毒（caulimoviruses）（Al Kaff and Covey，1995）尤为显著。从线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）侵染后又恢复为不表现症状的幼嫩叶片中能够分离到病毒（Wingard，1928）。从种传的无症状的幼苗中也能够分离到线虫传多面体病毒属病毒（Lister and Murant，1967）。

AMV 侵染 *N. tabacum* 后能够恢复，但在苋色藜（*C. amaranticolor*）中却不能（Ross，1941；Gibbs and Tinsley，1961）。在恢复的烟草叶片中仍能分离到病毒（Gibbs and Tinsley，1961）。病毒在烟草植株的含量以循环方式升降（Hull，1969）（图 10.12）。

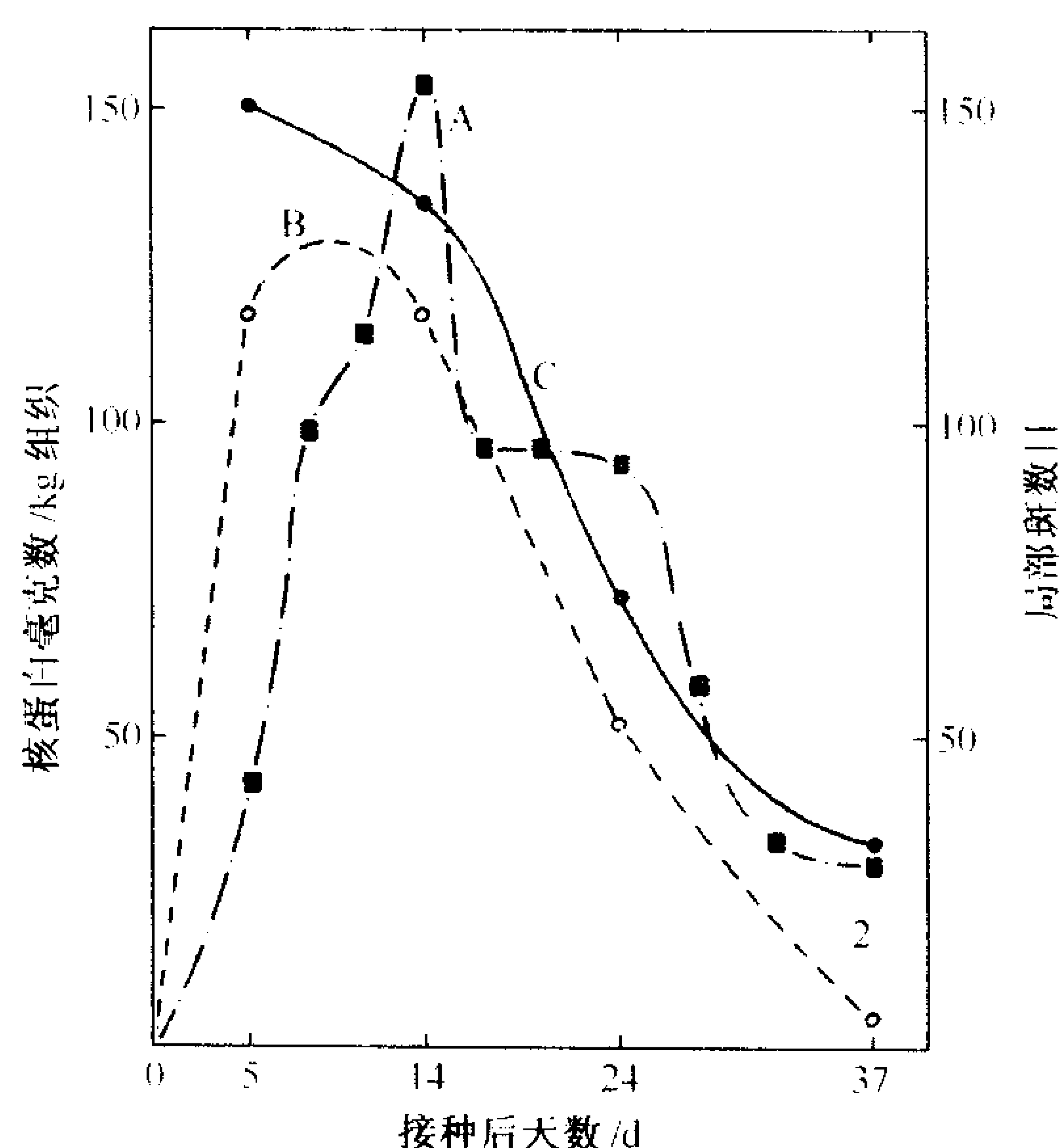


图 10.12 接种后不同时间从完整烟草植株中提纯的 AMV 的浓度与比（单位）侵染性。零枯斑设定为 0 时。曲线 A．提纯的病毒核蛋白的量（mg/kg 整叶的鲜重）；曲线 B．汁液接种诱发的局部斑的数目；曲线 C．提纯的病毒样品经分光光度计测定等量化后接种诱发的局部斑的数目（承蒙惠允，引自 Kuhn 和 Bancroft（1961））

Ratcliff (1999) 报道许多能够恢复的病毒（除 CaMV 外）都具有侵入分生组织的能力，这可能与病毒的花粉传播有关。

第Ⅳ节 寄主的内在反应

A. 基因沉默

第 16 章第Ⅶ节所述的应用基因工程介导植物对病毒的抗性的首要目的是通过表达病毒序列来干扰靶标病毒的正常功能。最初的方法是表达野生型或突变的病毒基因以期基因产物能够阻止病毒复制或增殖中的关键步骤。但是，数个系统中的发现表明，转基因植物对病毒侵染的抗性机制在一些情况下与预测的不同。这些发现包括：

• 在许多情况下，是基因的转录产物而不是蛋白质参与有效的保护。例如，转 PLRV 外壳蛋白基因的一些马铃薯株系表现出对病毒的高水平抗性，但却检测不到外壳蛋白（Kawchuk *et al.*，1991）。通过分别转翻译缺陷型 N 基因和外壳蛋白获得了对 TSWV 和 TEV 有抗性的烟草植株（de Haan *et al.*，1992；Lindbo and Dougherty，1992）。

• 通常低水平表达转病毒基因的植物比高水平表达转基因的植物抗性更高。因此，在转 TSWV 的 N 基因的转基因植物中，转录水平最低的植物表现出最高水平的抗性（Pang *et al.*，1993）。

• 一些转完整或局部 TEV 外壳蛋白基因的烟草系在最初可被 TEV 侵染，但经过 3～5 周后，植物就恢复了。恢复的组织不能再被 TEV 侵染，从其中分离的原生质体也不能被侵染。在恢复的组织中，稳态存在的转基因 RNA 显著降低，而核失控（nuclear run-off）研究发现转基因转录速率在恢复组织和未接种组织间没有差别（Lindbo *et al.*，1993）。

这些发现和其他一些发现表明抗性可能是由于依赖于同源性的基因沉默。为验证这一可能性，在转 PVX 复制酶基因的烟草系间进行了杂交（Mueller *et al.*，1995）（图 10.13）。

一些杂交系（如 3.3 系）对病毒有抗性，转基因表达水平低；而其他系（如 3.2 系）感病，转基因以相对高的水平表达。这两个系间杂交获得的对病毒表现出抗性的所有后代中的转基因均只有低水平表达。与非转基因烟草杂交获得的后代表现转基因双亲的表型。这些观察与越来越多的导致转基因和内源基因表达受到共抑制（cosuppression）的转植物内源基因的例子一致（Napoli *et al.*，1990；van der Krol *et al.*，1990）。这一共抑制可能是由于转录基因沉默（transcriptional gene silencing，TGS），也可能是由于转录后基因沉默（post-transcriptional gene silencing，PTGS），或者可能是二者结合的结果（Depicker and van Montagu，1997；Vaucheret *et al.*，1998；Matzke *et al.*，2000）。

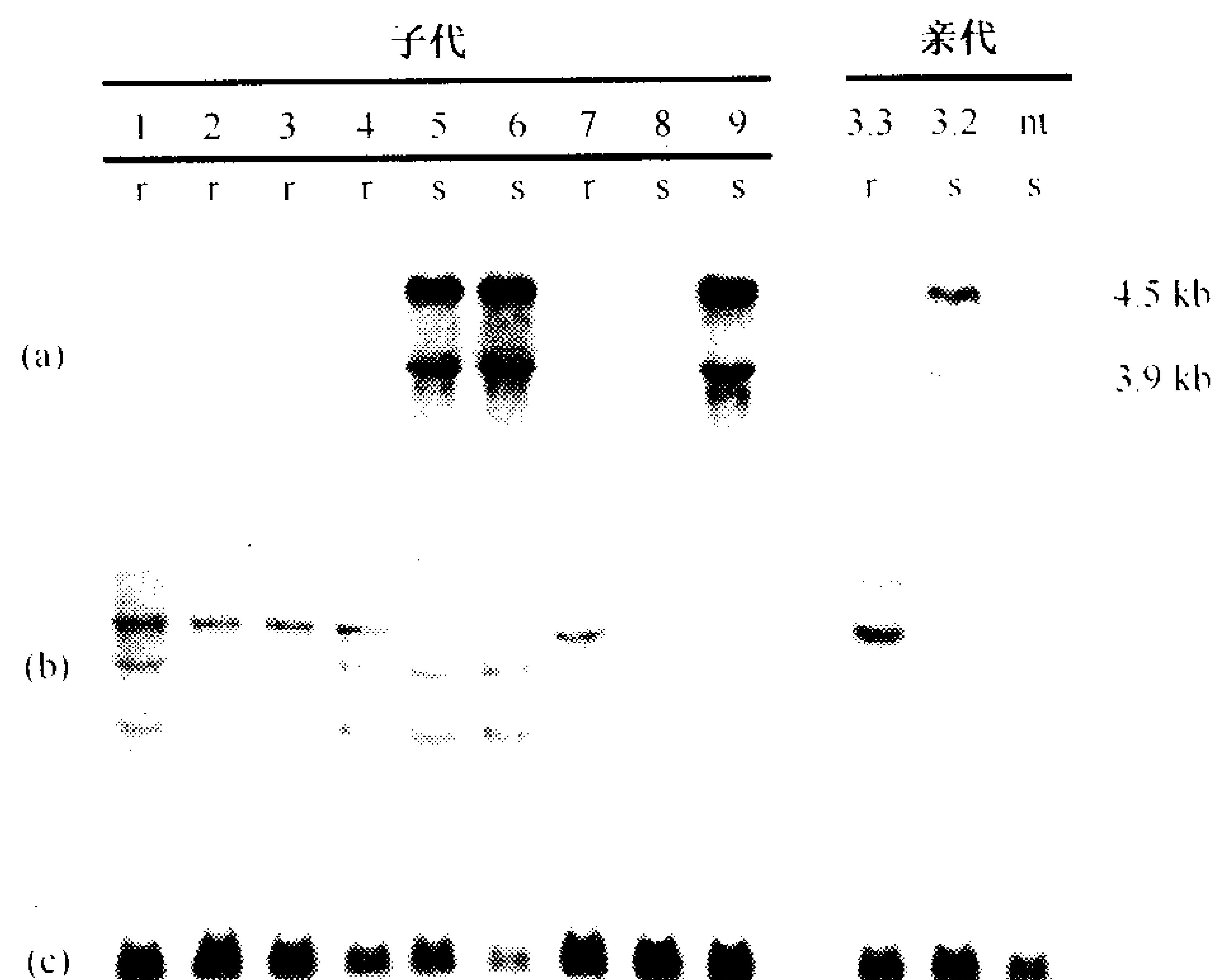


图 10.13 PVX 复制酶转基因植株、3.2（感 PVX）和 3.3（抗 PVX）等烟草系杂交后代的分析。在植株处于 5 叶期时采收叶片用于 RNA 分析。用 PVX RdRp DNA 的 1.6 kb 片段为探针对总 RNA（8 μg）样品进行凝胶印迹分析（a）；用 rubisco 小亚基探针证实 RNA 样品的等量加样（c）。每个烟草系的基因型均用 *Eco*RV 酶切的总 DNA（8 μg 泳道）进行 DNA 凝胶印迹分析（b）。在去掉叶片样品用于 RNA 分析后，用 PVX 接种这些植株，在接种后 14 天，根据系统花叶症状的出现与否分别认定为感病（s）或抗病（r）。在每一个阶段的分析均包括 3.2.2 和 3.3.1 以及非转化的烟草系用于比较并分别标记为 3.2、3.3 和 nt。承蒙版权所有者（Blackwell Science Ltd.）惠允，引自 Mueller 等（1995）。

B. 转录和转录后基因沉默

表 10.7 列出了 TGS 和 PTGS 的主要特征。

表 10.7 基因沉默机制的普通特征

特征	位置依赖性的基因沉默	同源性依赖性的转录基因沉默（TGS）	同源性依赖性的转录后基因沉默（PTGS）
沉默序列与被沉默基因的同源性	无	有	有
被沉默靶标位点的特性	顺式序列	与启动子中沉默位点的同源性	与转录区域沉默位点的同源性
沉默位点的特性	不适用	常为正向或反向重复序列	常为正向或反向重复序列
沉默步骤	转录	转录	转录后
定位	细胞核	细胞核	细胞质
反式失活	无	有，准诱变的	有
表型	隐性	显性，有时为上位的	显性并且是上位的
蛋白质水平	显著降低	显著降低	降低
RNA 水平	显著降低	显著降低	降低
基因座的沉默容量			

续表

特征	位置依赖性的基因沉默	同源性依赖性的转录基因沉默（TGS）	同源性依赖性的转录后基因沉默（PTGS）
位置效应的影响	不适用	强	可变的
序列组织的影响	不适用	强	强
基因座的沉默易感性			
位置效应的影响	强	可变的	无
基因座组织的影响	可变的	可变的	无
沉默诱导物信号	借助非编码 RNA 和沉默蛋白阈值的发育调控	DNA-DNA 配对导致的顺式与反式失活	阈值
沉默效应子	沉默蛋白和（或）非编码 RNA 介导异染色质化	染色质的甲基化与包裹	降解体与反义 RNA
基因的甲基化	存在于启动子或完全的基因座中	存在于启动子或完全的基因座中	若出现，则存在于转录区及其下游
稳定性/持续性	减数分裂的重新设定发育控制的	不同程度地持续	减数分裂的重新设定 非常见的体细胞重新设定 发育控制
环境易感性	是（基因调控） 否（遗传程序）	可变的	是（弱沉默基因座） 否（强沉默基因座）
例证	顺式调控的元件与增强子 位置效应彩斑 X 染色体剂量补偿	自然排列依赖于同源性的转基因、内源基因与转座子的沉默	自然的反式沉默转基因表达的变异共抑制病毒诱导的基因沉默

因为大多数植物病毒含有 RNA 基因组、在细胞质中复制，因此转基因抗性是由 RNA 参与的 PTGS 机制操纵的。English 等（1996）在一个重要的实验中表明 PTGS 在含有一个靶标序列的整个 RNA 上起作用。将在三基因块（triple-gene block）和外壳蛋白基因间插入 β-葡萄糖苷酶（GUS）或绿色荧光蛋白（GFP）基因的 PVX 载体（PVX基因组组构见第 6 章第Ⅷ节 H. 3）接种到转 GUS 基因的烟草植物中，GUS 基因以低水平或高水平表达；低水平表达的植物表现 PTGS，而高水平表达的植物中没有表现 PTGS。低水平表达的植物对 PVX∷GUS 载体中 GUS 和 PVX 表现出了抗性，但对 PVX∷GFP 载体无抗性。高水平表达 GUS 转基因的植物对这两个载体均敏感(图 10. 14)。

各种实验已经表明 PTGS 对核酸序列是高度特异性的。例如，上面的例子证明接种到 GUS 转基因的植物的 PVX 载体针对 GUS 插入片段（insert）而不针对 GFP 插入片段。一个基于 TEV 外壳蛋白的 PTGS 转基因抵抗 TEV 的侵染但不抵抗其他的马铃薯 Y 病毒属病毒（potyviruses）（Lindbo *et al.*，1993）。

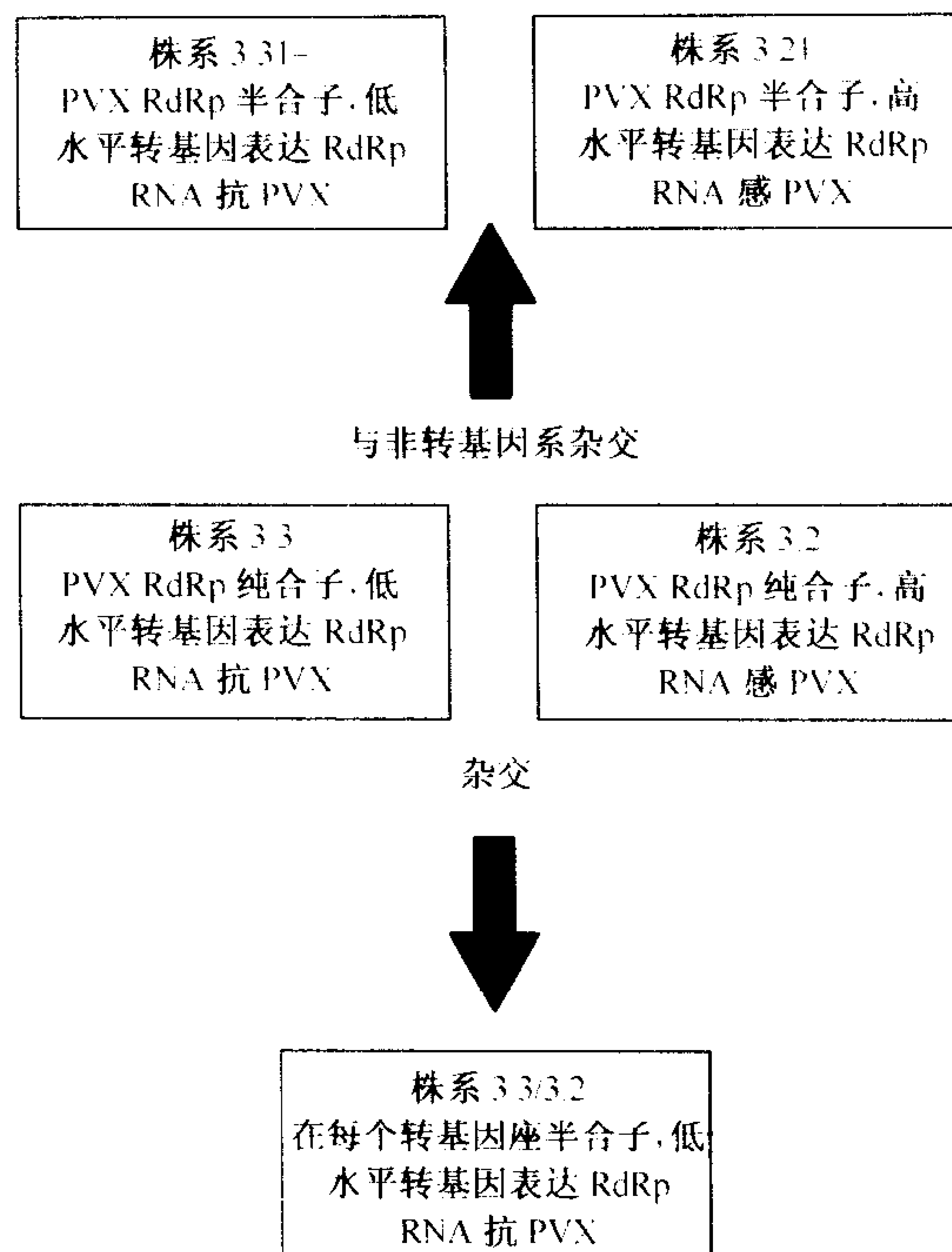


图 10.14 病毒抗性与 PTGS 相互关系的实验性测验。3.3 系和 3.2 系为带有 PVX RdRp 转基因的烟草系。该图描述了携带这些单独或组合基因的植株的表型,并且表明了如何得出结论认为赋予对 PVX 抗性的 PVX RdRp 转基因也能够诱发 PTGS。原始数据已由 Mueller 等(1995)发表。与非转化的植株杂交(上排)揭示了这些烟草系的转基因表型不受转基因剂量的影响。两个系之间的杂交表明 3.3 系可能抑制 3.2 系中转基因的表达。这些结果还证明 PVX 抗性与转基因的低水平表达对于高水平表达和 PVX 感病性是上位的。承蒙版权所有者(Springer Verlag GmbH and Co. KG.)惠允,引自 Baulcombe(1999a)

C. 参与 PTGS 的基因

在其他真核生物中也已发现了 PTGS 现象,并对其进行了相当深入的研究。在真菌中称为"抑制"(quelling),在线虫和果蝇中称为 RNA 干扰(RNAi,RNA interference)(Gura,2000;Marx,2000)。通过研究这些生物以及拟南芥的 PTGS 缺陷型突变体,鉴定了被认为是参与这一防卫途径的几个基因(Morel and Vaucheret,2000)。

在真菌——脉孢菌(*Neurospora crassa*)(Cogoni and Macino,1999a)和拟南芥(Dalmay *et al.*,2000)中 PTGS 需要一个依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase,RdRp)(QDE-1)的参与。在鉴定的拟南芥 4 个沉默缺陷型基因座的突变体(*sde*)之一,*sde 1*,是来自 *N. crassa* 的 RdRp——QDE-1 的同源物(homolog)。尽管 *sde* 突变影响转基因沉默,但它们对病毒引起的基因沉默没有任何作用(Dalmay *et al.*,2000)。在一个类似的研究中,Mourrain 等(2000)分离了 PTGS 减弱的两个拟南芥突变体 *sgs2* 和 *sgs3*。SGS2 蛋白与 *N. crassa* 的 QDE-1 蛋白以及线虫(*Caenorhabditis elegans*)的 EGO-1 相似,二者均为 RdRp;EGO-1 作用于 RNAi

(Smardon *et al.*, 2000)。SGS3 蛋白和其他 sde 蛋白的功能还不清楚，但这些蛋白质可能参与植物中的 PTGS 途径。对一个 PTGS 进一步减弱的拟南芥突变体 AGO1 的分析发现对 PTGS 所需的氨基酸在 QDE-2 和 RDE-1 中一个高度保守的模体中也存在（Fagard *et al.*, 2000）。

衣藻（*Chlamydomonas reinhardtii*）的一个突变体，*Mut 6*，对一个转基因和两个转座子家族的沉默是必需的，此基因编码的产物与 RNA 解旋酶的 DEAH 框家族是同族的（Wu-Scharf *et al.*, 2000）。一个不同的由基因 *smg-2* 编码的解旋酶参与 *C. elegans* 中的 PTGS（Domeier *et al.*, 2000），另一个是 *N. crassa* 中与 RecQ DNA 解旋酶相关的 QDE-3（Cogoni and Macino, 1999b）。通过突变体已经鉴定了一个类似于 RNase D 的蛋白质（Ketting *et al.*, 1999）和一个由 *piwi/sting/argonaute/zwille/eIF2C* 基因家族编码的蛋白质（Tabara *et al.*, 1999）；后者的结构域构成包括由 Cerutti 等（2000）描述的 QDE-2 和 RDE-1 蛋白。

D. 转录后基因沉默机制

转录后基因沉默（PTGS）作用于转基因、逆转录元件和 RNA 病毒。PTGS 作用的靶标大部分情况下是正义 RNA（Baulcombe, 1996b），表明 PTGS 机制通过反义 RNA 起作用（Dougherty and Parks, 1995）。基因沉默可以由正义 RNA 和反义 RNA 的同时表达而引起（Waterhouse *et al.*, 1998），并且带有内含子的发夹结构能有效地引起沉默（图 10.15）（Smith *et al.*, 2000）。

许多早期的研究致力于寻找大小在 200～500 bp 范围内的反义 RNA 分子，但没有发现。然而，当 Hamilton 和 Baulcombe（1999）研究植物中 4 种类型的 PTGS 时，他们在下述 4 种情况下均检测到大约 25 nt 的转基因或病毒的正义 RNA 和反义 RNA 分子：①共抑制内源 1-氨基环丙烷-1-羧酯脱氧酶（1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, ACO）的番茄系；② CaMV 35S 启动子驱动表达 GUS 转基因的一个烟草系与含有 35S 启动子抑制子的转基因系杂交；③用含有双价载体（包括 GFP 序列）的土壤杆菌浸润本生烟以表达 GFP；④PVX 侵染的植物。这些 RNA 分子在表现 PTGS 的植物中积累但从未在缺乏 PTGS 的植物中发现。类似地，在果蝇中，RNAi 导致 21～23 nt 的 mRNA 片段形成（Sharp and Zamore, 2000；Zamore *et al.*, 2000）。Meins（2000）和 Waterhouse（2001）综述了 PTGS 中所涉及的 RNA 降解。

因此，PTGS 的靶标是 dsRNA（Bass, 2000）。现已提出各种模型以解释这些反义 RNA 是如何产生的，其中两种模型已经得到深入的探讨（Baulcombe, 1999a）。第一种模型假定，转基因的插入位置与一个内源启动子（endogenous promoter）毗连，因此转录出反义 RNA。然而，这在几个方面来看不太可能。因为在反义 RNA 的直接转录与 PTGS 之间没有相关性（van Blockland *et al.*, 1994）；对转基因启动子的抑制导致 PTGS 的丧失（English *et al.*, 1997）。此外，它不能解释 PVX 侵染是如何导致 25 nt 反义 RNA 产生的（上面第 4 种情况）。第二个模型假设，反义 RNA 间接地产生于转基因的正义转录物（sense transcript）。这一个模型更为可信，因为它与现有的数据一致。迄今已经提出了 dsRNA 形成的各种可能的模板（template）。例如，据认为已整合的 DNA 的转录可产生异常 RNA（aberrant RNA）；RNA 病毒的复制涉及互补链

(A) 基因构建物	预测的RNA转录物的结构	% PTGS	n
正义 PVY*		7	27
反义 PVY*		4	25
hpRNA (PVY 臂, GUS 环)		58	43
hpRNA (PVY 臂, 反向内含子)		65	34
hpRNA(PVY 臂, 正义内含子)		96	23
正义 Δ12-脱氢酶†		10	41
反义 Δ12-脱氢酶†		15	21
hpRNA(Δ12-臂, 间隔环)		69	63
hpRNA(Δ12-臂, 内含子)		100	30

(B) 启动子　正义臂　内含子　反义臂　终止子

35S 或 油菜籽蛋白　PVY-Pro 脱氢酶　*Pdk* 脱氢酶　PVY-Pro 脱氢酶　章鱼碱合酶 胭脂碱合酶

图 10.15　用不同基因构建物诱导 PTGS 的效率以及转录自转基因的 RNA 结构的预测。(A) 测定的 PVY 与 Δ12-去饱和酶（脱氢酶）的 PTGS 效率作为对 PVY 免疫的独立转基因植株的百分率，以及具有酶活性的植株的百分率与野生型相比分别减少了 20%以上。就 RNA 转录物的预测的结构而言，向右指和向左指的箭头分别表示序列的正义和反义方向；小的垂直的箭头表示在内含子被剪接出去后的剪接点（splice-junction）序列。在预测的结构中的垂直线表示双链的形成。星号“*”表示来自 Waterhouse 等（1998）的数据；短剑符号“†”表示来自 Cartea 等（1998）的数据；hpRNA，发夹状 RNA；*n*，独立转化体的数目；GUS，β-葡糖醛酸糖苷酶。(B) 含有内含子的发夹状构建物的设计；OCS，章鱼碱合酶；NOS，胭脂碱合酶。承蒙版权所有者（Macmillan Magazines Ltd.）惠允，引自 Smith 等（2000）。

的合成。来自一个 RNA 模板（如异常 RNA）的反义 RNA 的转录需要依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（RdRP），而且此酶是粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*）（Cogni and Macino，1999）与拟南芥（Dalmay *et al.*，2000）的 PTGS 所需要的。如上一节所述，研究表明各种其他基因产物也可能参与了 PTGS。其中一些蛋白质也参与了正常的、调控真核生物 RNA 的加工和稳定性的分子网络（Wu-Scharf *et al.*，2000；Baulcombe，2000）。

由于新的性状（traits）可以通过转化而导入，因而不是所有的转基因都可诱导 PTGS。已经有各种不同的模型来解释这种现象（Waterhouse *et al.*，1999），其中一些提出当转基因的转录物超过某个水平的时候即可诱发 PTGS。由 Lindbo 和 Dougherty（1992a）以及 Dougherty 和 Parks（1995）为 PTGS 的诱发机制首先提出了“阈值”模型，如图 10.16 所示。

转基因的多拷贝能诱导其甲基化，研究表明它可能导致短的异常 RNA 的产生，继而诱导 PTGS 的发生（Waterhouse *et al.*，1999；Mette *et al.*，2000），然而并非所有情况的沉默都涉及 DNA 的甲基化（Wang and Waterhouse，2000）。

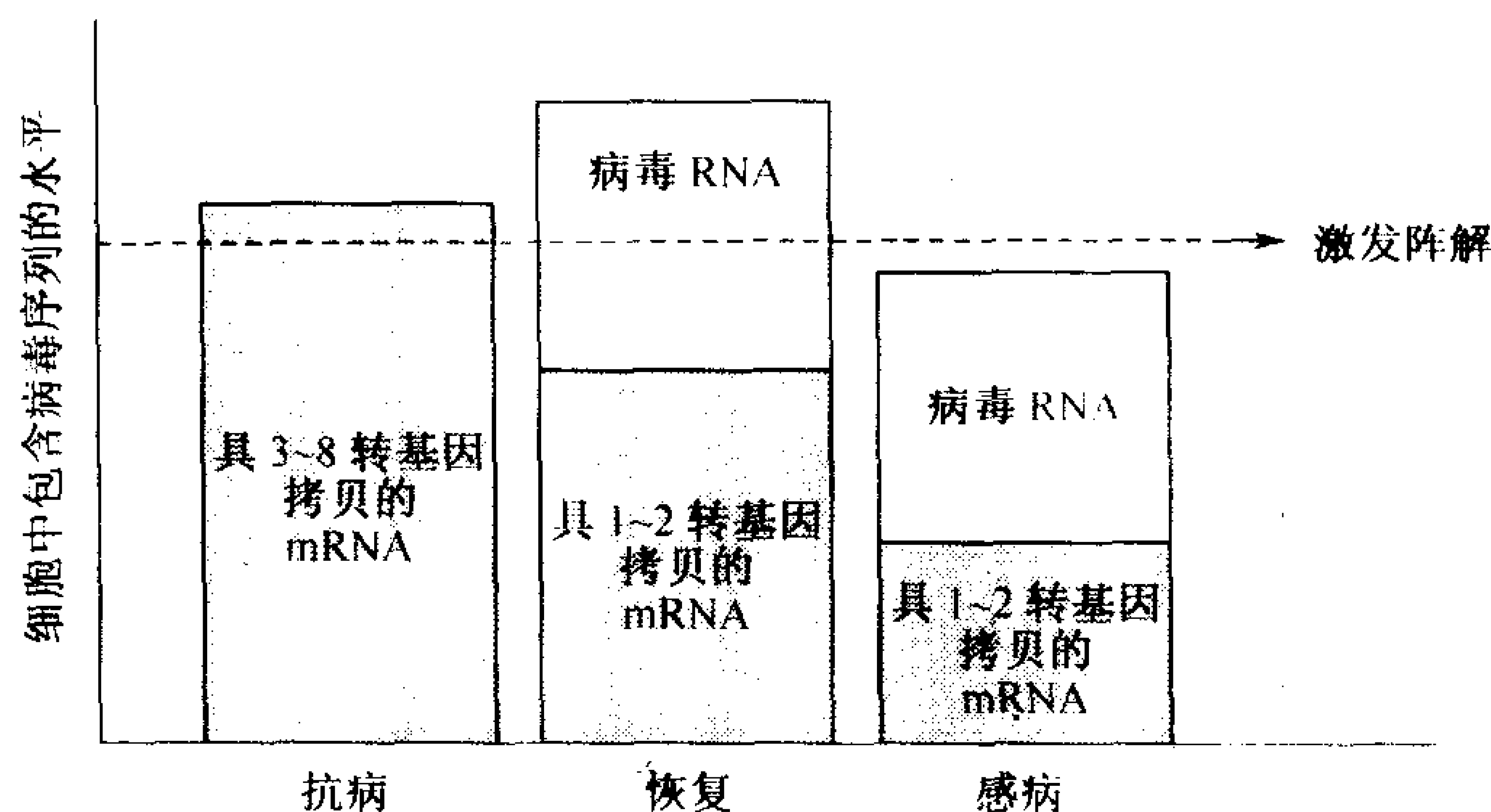


图 10.16 RNA 介导的病毒抗性（RMVR）的阈值模型。起始 RMVR 需要含有病毒序列的一定的 RNA 阈值。具有 3～8 个转基因的植株满足该水平，因而表现抗性。具有 1 个或 2 个转基因拷贝的植株只有在与来自病毒的 RNA 一起时才能超过该水平，因此在侵染以后的一定时间才表现出抗性。具有 1 个或 2 个转基因拷贝的其他植株即使与来自病毒的 RNA 在一起也不能超过该阈值，因而不表现抗性。承蒙版权所有者（Elsevier Science）惠允，引自 Waterhouse 等（1999）。

E. PTGS 的系统性信号转导（Fagard and Vaucheret，2000）

在嫁接实验中，即使砧木和接穗由 30 cm 长的非靶标的（non-target）野生型植物茎分开，表现 PTGS 的植株将这一特征（character）百分之百地从已经沉默的（silenced）砧木传播到非沉默的（non-silenced）、表达相应转基因的接穗中（Palauqui *et al.*，1997）。这表明一种转基因特异性的、可扩散的信使（diffusible messenger）介导着新生（de novo）PTGS 的扩增贯通该植株。Voinnet 等（1998）用带有 35S∷GFP 构建物的致瘤土壤杆菌（*A. tumefaciens*）浸润携带 GFP 构建物的转基因本生烟（*N. benthamiana*）的下部叶片，证明了系统性沉默作用的存在。在 7～14 天之后 GFP 的表达从上面的叶片中（尤其在叶脉周围）消失。该信号分子的性质尚不清楚，但是所有的证据（序列专化性，系统性位移）表明它可能是一种小的反义 RNA。转 β-葡糖醛酸糖苷酶（GUS）基因（*uidA*）用于表达 GUS 的烟草植株表现了 PTGS，因而在叶片和茎的横切面未出现 GUS 染色反应，但是茎端分生组织（shoot apical meristem）和腋生分生组织（axillary meristem）均出现了深蓝色的 GUS 染色反应（图 10.17）（Béclin *et al.*，1998）。这说明沉默并不影响分生组织，因此在每个叶片的发育期间发生。

F. 沉默的诱发和维持

利用病毒诱发的基因沉默（virus-induced gene silencing，VIGS）技术，Ruiz 等（1998）将携带内源的八氢番茄红素去饱和酶（脱氢酶）（phytoene desaturase，PDS）基因外显子的 PVX 载体接种到本生烟植株。PDS 的 mRNA 在所有的绿色组织中均受到影响。在将 PVX∷GFP 接种到转 GFP 基因的植株上后，PVX∷GFP 被沉默。Ruiz

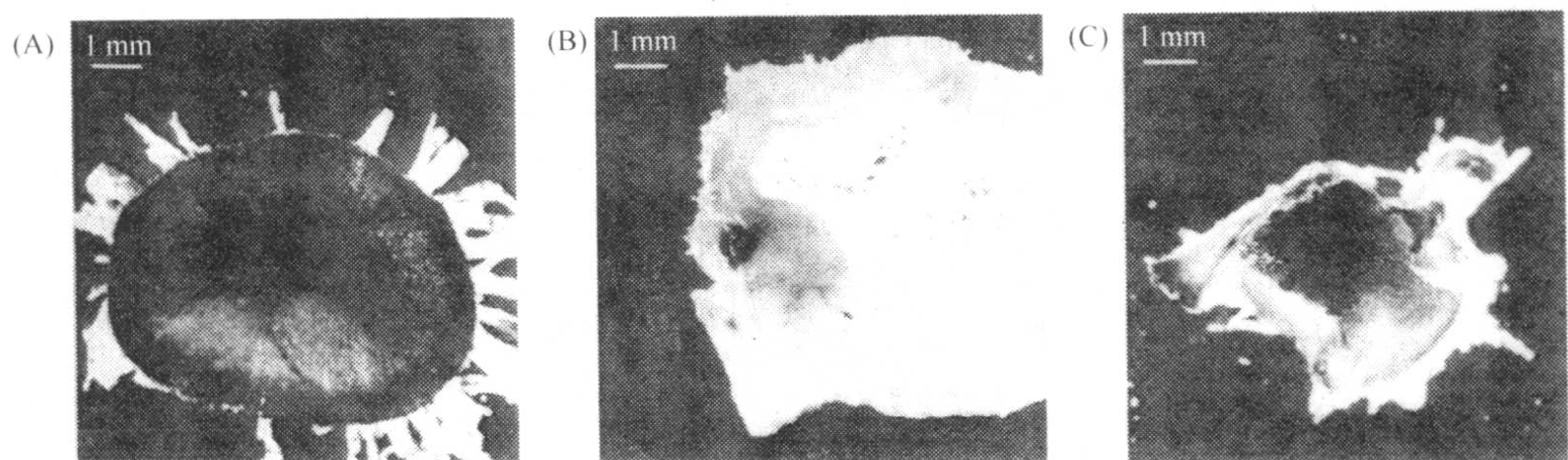


图 10.17 （见彩色图版 10.2）在分别发生沉默和非沉默的烟草植株的分生组织中，对 *uidA* 基因表达的组织化学分析。GUS 的组织化学分析利用了表现 *uidA* PTGS 的纯合子 6b5 烟草植株以及不表现 *uidA* PTGS 的半合子 23b9 植株的茎和茎尖。（A）非沉默的 23b9 植株的茎横切面的染色。（B）沉默的 6b5 植株的茎横切面的染色。一个非沉默的腋生分生组织作为一个深蓝色的斑点清晰可见。（C）一个沉默的 6b5 植株的条顶端分生组织的染色。承蒙惠允，引自 Béclin 等（1998）。

等（1998）通过对这些植株不同部位沉默作用的分析，认为 PTGS 分为两个阶段，即沉默的起始（initiation）和沉默的维持（maintenance）。由于转基因不是必需的，所以沉默的起始是一个 RNA 介导的防卫反应；而沉默的维持需要转基因的存在，或许涉及了依赖于 RNA-DNA 相互作用的转基因的甲基化（Jones *et al*.，1999）。因此，转基因植物中的 PTGS 分为 3 个阶段，即起始、系统性信号转导（systemic signaling）和维持。

G. 受病毒侵染植物中的 PTGS（Carrington and Whitham，1998；Marathe *et al*.，2000a；Carrington *et al*.，2001）

由于病毒既能起始转基因植物的基因沉默，又是基因沉默的靶标，因而 PTGS 可能是植物抵抗病毒和其他“外源”核酸的防卫系统的一部分［也称 RNA 介导的防卫（RNA-mediated defense，RMD），Voinnet *et al*.，1999］（Baulcombe，1996a；Pruss *et al*.，1997）。

通过进一步的观察，抗病毒的植物防卫反应和基因沉默作用之间的相似性得到了强化，这些观察结果包括：

（1）各种与图 10.18 中类似的实验表明携带同源基因的病毒侵染转基因植物导致了转基因表达的沉默。

（2）非转基因的植物在受到线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）侵染后，在接种的与首先系统性侵染的叶片上表现严重的病毒症状；然而，在系统性侵染之后长出的上部叶片无症状，而且比受系统性侵染的叶片中病毒的含量低（Wingard，1928）（第Ⅲ节 R）。这些恢复的（recovered）叶片对病毒的再接种（reinoculation）有抗性。当对受 TBRV 株系 W22 接种的克利夫兰烟（*N. clevelandii*）植株已恢复的叶片再用 PVX∷W22 构建物接种后，检测不到 PVX∷W22 的 RNA，这与对照植株中该 RNA 的高水

平表达形成对照（Ratcliff *et al.*，1997）。因此，PVX::W22 以一种与转基因植物中的PTGS类似的方式因 TBRV W22 对该植株的侵染而受到了抑制。

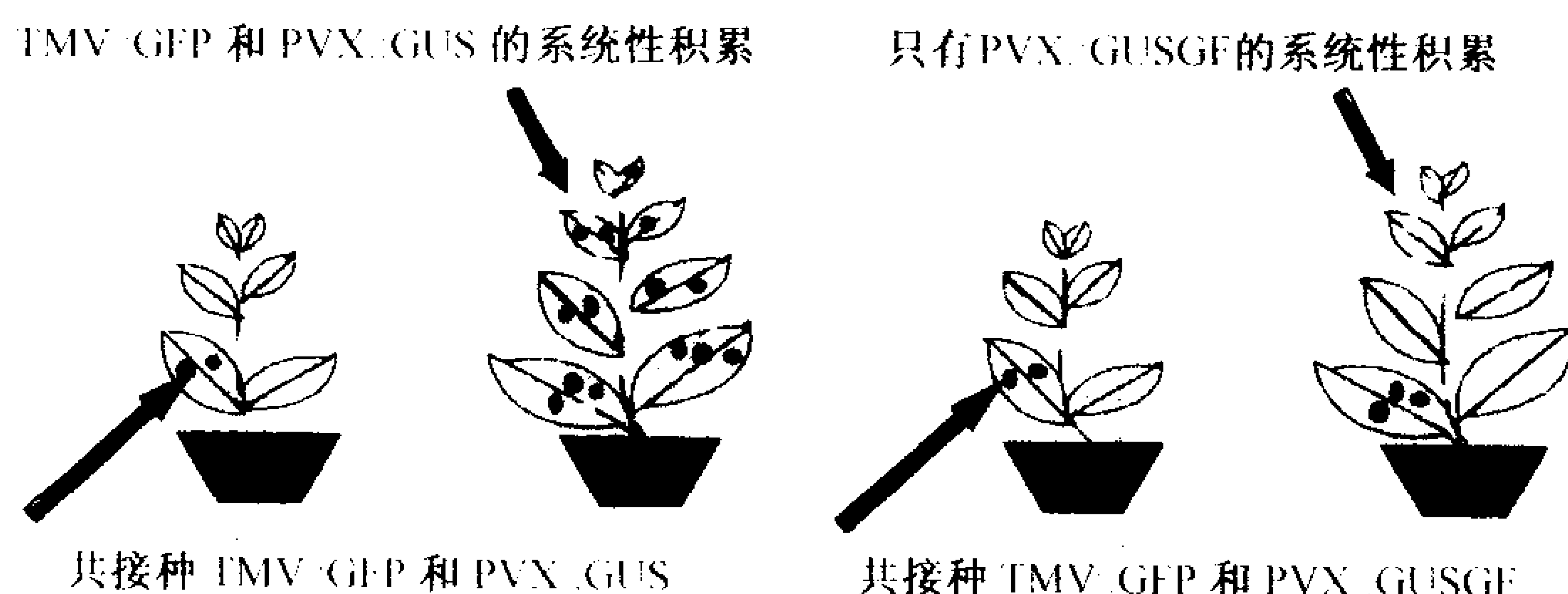


图 10.18 交互保护作用（PTGS）中 RNA 序列的特异性。用 TMV 和 PVX 载体构建物混合接种本生烟植株。TMV 载体为 TMV::GFP，PVX 载体为 PVX::GUS 或 PVX::GUSGF（GF 组分为 GFP 报道基因的5′部分）。在系统侵染的组织中对这两种载体构建物之间的交互保护作用加以评估（Ratcliff *et al.*，1999）。在用 PVX::GUSGF 和 TMV::GFP 接种的植株中，发生了涉及 TMV 构建物中的 GFP 序列和 PVX::GUSGF 中来自 GFP 的 GF 序列之间的相互作用。这种相互作用的结果是发生了交互保护以及随后植株中系统侵染部分对 TMV::GFP 的抑制，这可能涉及了类似 PTGS 的机制。承蒙版权所有者（Springer Verlag GmbH and Co. KG.）惠允，引自 Baulcombe（1999a）

（3）甘蓝（*Brassica oleracea gongylodes*）植株在接种 CaMV 后，最初表现系统性症状，随后完全恢复。这种恢复与病毒复制中间物的显著改变同时发生（CaMV 的复制周期见第 8 章第Ⅶ节 B）。该病毒的微型染色体（minichromosome）累积，但是两种主要的聚腺苷酸化（polyadenylated）病毒 RNA 的水平迅速降低，而非聚腺苷酸化的片段持续存在（Covey *et al.*，1997）。这些病毒复制中间物水平的变化与终止病毒复制的基因沉默是一致的。

然而，抗病毒侵染的寄主防卫这两个例子之间的不同在于 TBRV RNA 的复制是在细胞质中，而副逆转录病毒（pararetrovirus）CaMV 的 DNA 的复制是既在细胞核中又在细胞质中。TBRV 的沉默与 PTGS 机制是一致的，然而有证据表明 CaMV 的沉默涉及 PTGS 与 TGS 两种机制（Al Kaff *et al.*，1998；Covey and Al-Kaff，2000）。

因此，可以认为 PTGS 是植物对病毒侵染的一般化反应（generalized response）。这就提出了这种防卫反应是如何起始以及如何维持的问题。由于 RNA 病毒经由互补链复制，因此 dsRNA 的形成是复制循环的一个组成部分。该复制中间体（replication intermediate），或者由寄主的 RdRp 转录形成的 dsRNA，可能是产生 22～25 nt 的特征性降解产物途径的一个靶标（Ruiz *et al.*，1998）。据推测信号的系统性移动可能与上述转基因的情况类似。如果 PTGS 的作用比病毒的传播更迅速，则病毒将不能从侵染的位点移动出去。如果病毒的移动比 PTGS 更快，将会建立系统性侵染，其效力取决于病毒的“侵袭力”（攻击性，aggressiveness）与 PTGS 的“反应性”（responsiveness）。涉及病毒“侵袭力”方面的因素将在下一节中讨论。

H. 基因沉默的抑制

很明显，如果 PTGS 是植物对抗“外源”核酸的常规防卫系统，那么病毒为了成功地建立侵染必须克服这种防卫。

在研究 PVX 与 PVY 之间协同性相互作用（synergistic interaction）的介导者（第Ⅴ节 F.4）时，Pruss 等（1997）发现 TEV 的 HC-Pro 基因使这种协同作用成为可能，并且提出这可能是由于它干扰了寄主的一种防卫系统。Anandalakshmi 等（1998）以及 Kasschau和 Carrington（1998）的实验结果证实了马铃薯 Y 病毒属病毒的（potyviral）HC- Pro 确实抑制了 PTGS 的作用。这两个研究组实质上应用了相同的手段，即用包含各种插入片段的病毒载体接种转基因植物。表 10.8 和图 10.19 总结了这些实验结果。

表 10.8　证明 TEV P1/HC-Pro 抑制基因沉默的实验

植物	转基因的基因型		侵染	
	Gus	P1/HC-Pro	TEV-GFP	TEV-GUS
非转基因的	—	—	+++	+++
407	2n	—	++	—
F_3 代				
U-6B×407＃34	—	—	+++	+++
U-6B×407＃7	2n	—	+++	—
U-6B×407＃17				
P1/HC-Pro（+）	2n	1n/2n	+++	+++
P1/HC-Pro（—）	2n	—	+++	—
407×U-6B＃13	—	—	+++	+++
407×U-6B＃9	2n	—	+++	=
407×U-6B＃25				
P1/HC-Pro（+）	2n	1n/2n	++	+++
P1/HC-Pro（—）	2n	=	+++	—

实验系统：

表达非翻译 GUS 基因（407 系）转基因本生烟（N. *benthamiana*）；

两个 TEV 的侵染性 cDNA：含有 GUS 基因的 TEV-GUS 与含有 GFP 基因（插在 P1 与 HC-Pro 之间）的 TEV-GFP。407 系对 TEV-GUS 免疫，对 TEV-GFP 感病。

表达 TEV P1/HC-Pro 基因的本生烟 U-6B 系。

407 系与 U-6B 系杂交，F_1 代自交产生 F_2 代，F_3 代的情况见本表。

有 3 种表型。纯合子的 GUS；半合子的 P1/HC-Pro（＃17，＃25）；纯合子的 GUS：nul（无效等位基因）P1/HC-Pro（＃7，＃9）；nul GUS：nulP1/HC-Pro（＃34，＃13）。

承蒙版权所有者（© Elsevier Science）惠允，引自 Kasschau 和 Carrington（1998）。

自从得到这些病毒抑制基因沉默的最初的证明以后，研究表明其他一些病毒也有这种现象。Voinnet 等（1999）利用 PVX 载体系统研究了 16 种病毒，其中 12 种病毒表现了抑制现象（表 10.9）。

Brigneti 等（1998）的实验（图 10.20）证实了 TEV 与 CMV 对基因沉默的抑制（Béclin *et al.*，1998），CMV 的 2b 基因参与了抑制，并且抑制是由蛋白质而非核酸所介导的。该蛋白质通过富精氨基酸的核定位信号（arginine-rich nuclear localization signal）（^{22}KRRRRR^{27}）定位于核中（Lucy *et al.*，2000）。其核靶向（nuclear targeting）特性是抑制 PTGS 所必需的。

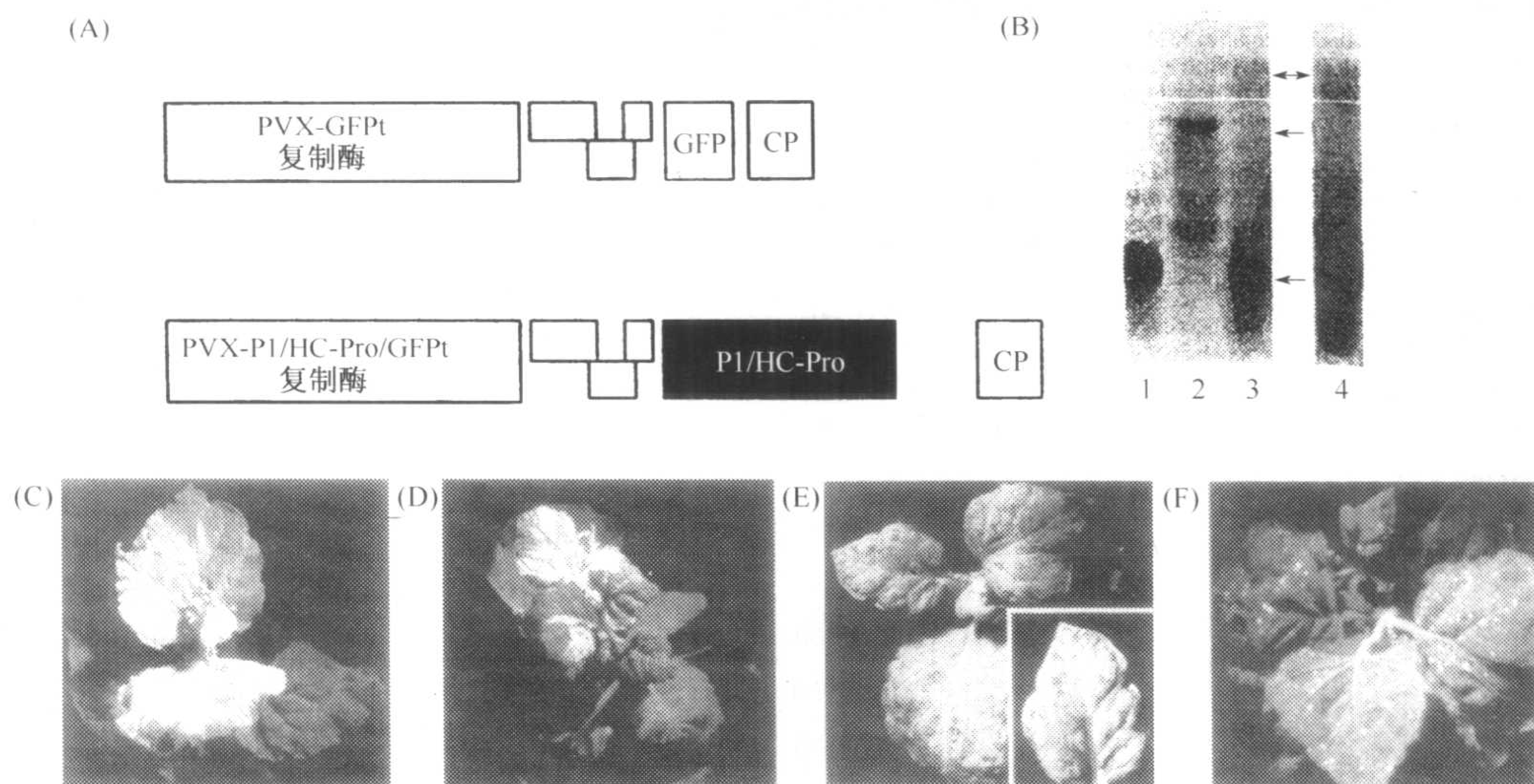


图 10.19 （见彩色图版 10.3）在病毒混合侵染时转基因编码的 GFP 受到病毒诱导的基因沉默作用（VIGS）。（A）携带着 GFPt 编码序列（PVX-GFPt）的 PVX 载体构建物或 TEV P1/HC-Pro 序列和 GFPt 的示意图。GF-Pt 是 GFP 的 S65T 突变体结构。（B）用 Northern 印迹法测定在模拟接种的 GFP 转基因植株（泳道 1）或用 PVX-GFPt（泳道 2）或 PVX-P1/HC-Pro-GFPt（泳道 3 和 4）侵染的植株中 GFP 转基因 mRNA 的水平。泳道 4 的曝光时间比泳道 3 的长 3 倍。接种后 20 天从这些植株的上部叶片中提取总 RNA；应用了 GFP 基因特异性探针。箭头（从上到下）分别指出了 PVX-P1/HC-Pro/GFPt 基因组 RNA、PVX- GFPt 基因组 RNA 和 GFP 转基因 mRNA 的位置。（C）～（F）为转基因 GFP 本生烟植株用各种载体构建物共接种后的结果；（C）用 PVX-GFP 和 PVX-5′TEV 共接种的植株表现出 GFP 的 VIGS 受到完全抑制；（D）PVX-GFP 与 PVX-HC 共接种的植株表现出 GFP 的 VIGS 几乎受到完全抑制；（E）PVX-GFP 和 PVX-HC 共接种的植株表现出 GFP 的 VIGS 受到部分抑制；（F）PVX-GFP 与 PVX-noHC 共接种的植株中的 GFP 表现出完全的 VIGS（无抑制）；红色荧光为叶绿素的自发荧光。承蒙版权所有者（© The National Academy of Sciences，USA）惠允，引自 Anandalakshmi 等（1998）。

Voinnet 等（1999）鉴定了参与基因沉默抑制的其他 3 种病毒基因产物（表 10.9），并注意到除了它们时常被鉴定为“致病性决定因素”以外，在它们之间未发现任何共同的特征。在抑制的程度和空间细节上也存在差异，如从全部受侵染叶所有组织中的抑制到只有新生叶片叶脉中的抑制等。这表明抑制子可能靶向基因沉默机制的不同部分。例如，如果抑制子阻断沉默的起始阶段，它会在新生叶片中出现，此处病毒正在开始合成；然而如果它抑制维持阶段，则会在老叶和幼叶中均出现（Brigneti *et al.*，1998；Voinnet *et al.*，1999）。现有证据表明马铃薯 Y 病毒属病毒（potyviruses）的 HC-Pro

抑制沉默的维持阶段，而黄瓜花叶病毒属病毒（cucumoviruses）的2b蛋白阻断信号转导阶段（signaling stage）（Brigneti *et al.*，1998）。此外，抑制沉默的维持阶段的情况也有差异：TMV、CPMV与TBSV只抑制在叶脉附近的沉默，而其他一些病毒可抑制老叶和幼叶的所有部分（表10.9）。这可能说明，在叶脉为主的表型中，抑制作用靶向于沉默的系统性信号（systemic signal）（Voinnet *et al.*，1999）。

表10.9 各种植物病毒对GFP mRNA转录后基因沉默（PTGS）的抑制

病毒属*	病毒	PTGS的抑制	老叶（OL）或新叶（NL）	整叶或脉中心	蛋白质	其他已知功能
Alfamovirus	AMV	0/9	—	—	—	—
Comovirus	CPMV	5/6	OL与NL	脉中心	?	
Cucumovirus	CMV	20/20	只有NL	整叶	2b	寄主专化性长距离移动
Geminivirus	ACMV	6/6	OL与NL	整叶	AC2	病毒粒体义基因 表达反式激活蛋白
Nepovirus	TBRV	0/6	—	—	—	—
Potexvirus	PVX	0/9	—	—	—	—
	FoMV	0/9	—	—	—	—
	NMV	8/9	OL与NL	整叶	?	—
	NVX	7/9	OL与NL	整叶	?	—
	VMV	7/9	OL与NL	整叶	?	—
Potyvirus	PVY TEV TEV	10/10	OL与NL	整叶	HC-Pro	基因组扩增 病毒协同作用，长距离移动，多聚蛋白加工，蚜虫传播
Sobemovirus	RYMV	—	—		P1	病毒积累，长距离移动
Tobamovirus	TMV	4/6	OL与NL	脉中心	?	
Tobravirus	TRV	7/9	OL与NL	整叶	?	
Tombusvirus	TBSV	7/9	只有NL	脉中心	19 kDa	寄主专化性移动与症状决定因素

* 病毒属名的中文名见附录2C。

GFP的PTGS通过农杆菌浸润在转基因本生烟中得到诱发如Voinnet等（1999）所述。承蒙版权所有者（© The National Academy of Sciences，USA）惠允。

OL，老叶；NL，新叶；整叶，整个叶片；脉中心，以叶脉为中心的（vein centric）

为了分析马铃薯Y病毒属病毒HC-Pro介导的PTGS途径的抑制点，Llave等（2000）通过将土壤杆菌（*Agrobacterium*）注射进带有沉默的GUS转基因的植物组织内，借此将HC-Pro瞬间导入植株。他们通过靶向一个持续需要的或相当不稳定的因子，确认HC-Pro可抑制一个或多个（沉默）了维持步骤。他们证明HC-Pro可抑制小RNA积累所必需的一个步骤，而且它还降低转基因序列中胞嘧啶甲基化的水平。PTGS转基因座（transgene locus）的甲基化可能受到小RNA的引导，小RNA可能从细胞质扩散到细胞核并与染色体DNA相互作用。一个寄主的基因沉默抑制子在另一个

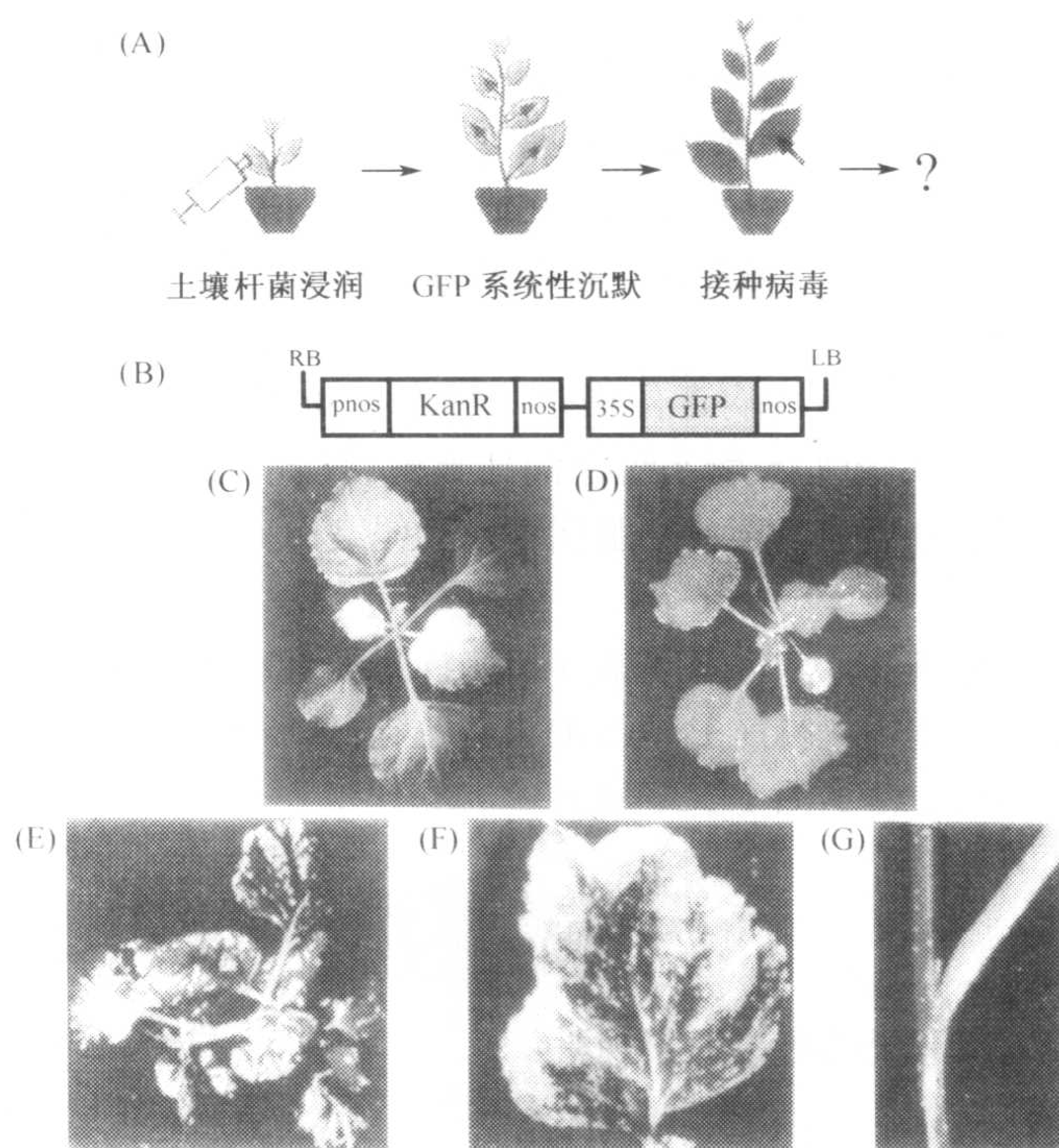


图 10.20 （见彩色图版 10.4）通过土壤杆菌（*A. tumefaciens*）浸润诱发的 GFP 转基因的 PTGS 以及随后由 PVY 产生的对 PTGS 的抑制作用。（A）实验系统的示意图。GFP 沉默由携带着一种双元 Ti 质粒（B）的土壤杆菌的一个强致病性菌株的浸润诱发的。（B）双元 Ti 质粒盒（cassette）的结构，用于培育表达 GFP 的转基因本生烟植株并通过土壤杆菌（cor308 菌株）的浸润在该转基因系中诱发 GFP 沉默。T-DNA 的右翼和左翼（RB 和 LB）之间为与一个 nos 启动子（pnos）和 nos 终止子（nos）盒前后串联的卡纳霉素抗性基因（*KanR*）。（C）在 UV 照射下观察到转基因本生烟植株表现了 GFP 的高水平表达。（D）用携带着双元 Ti 质粒（B）的土壤杆菌浸润转基因本生烟诱发的基因沉默。（E）～（G）PVY 对 PTGS 的抑制作用。用 PVY 侵染 15 天后，在 UV 照射下观察到的发生 GFP 沉默的转基因本生烟［如（C）所示］。（E）全株；（F）叶片的放大照片；（G）茎的放大照片。承蒙版权所有者（The Oxford University Press）惠允，引自 Brigneti 等（1998）。

寄主中可能引起不同的反应。例如，TAV 的 2b 基因，插入一个 TMV 载体中，就作为一个毒力决定因素抑制 *N. benthamiana* 中的 PTGS（Li *et al.*，1999）。然而，同一个基因在普通烟（*N. tabacum*）中却引起 HR。

植物病毒的 PTGS 抑制子，P1/ HC-Pro 和 2b 基因，不抑制转录基因沉默（transcriptional gene silencing，TGS）（Marathe *et al.*，2000b）。

I. 避免 PTGS 的其他机制

表 10.9 说明，至少在所用的载体系统和寄主中，并非所有的病毒都能抑制基因沉默。因此，一些病毒可能有避免（开）寄主防卫系统的其他机制。Brigneti 等（1998）提出，似乎没有抑制机制的 PVX 可能通过非常迅速的复制和传播克服寄主的防卫系统或者可能通过区室化（compartmentalization）避开防卫反应。

J. 讨论

人们通过对植物拥有的抵抗病毒的普通防卫系统的认识，已经得到病毒和植物相互作用的许多方面的潜在答案，但是同时又提出了许多问题。植物（PTGS）、真菌（抑制，quelling）（Cogoni and Macino，1999c）与动物（RNAi）防卫的普通特征表明这可能是一个控制“外源”核酸的古老系统，并且或许在发育期间参与基因表达的调控（Fagard *et al.*，2000；Matzke *et al.*，2000）。

现在开始认为 PTGS 和植物病毒侵染是一种在植物中建立侵染并移动的病毒与对“外源”核酸的侵入做出反应的植物系统之间的平衡和反平衡（counter-balance）。这些相互作用的结果可以解释为什么某些细胞区域受到侵染而其他区域不受侵染，如普通的花叶症状即是如此。

外部因素（如环境条件）和内部因素（如植物基因组）在病毒对植物的初始侵染的结果方面发挥着重要的作用。目前 PTGS 的机制正在开始得到阐明。PTGS 的总的轮廓以及与转基因表达的相似性如图 10.21 所示。

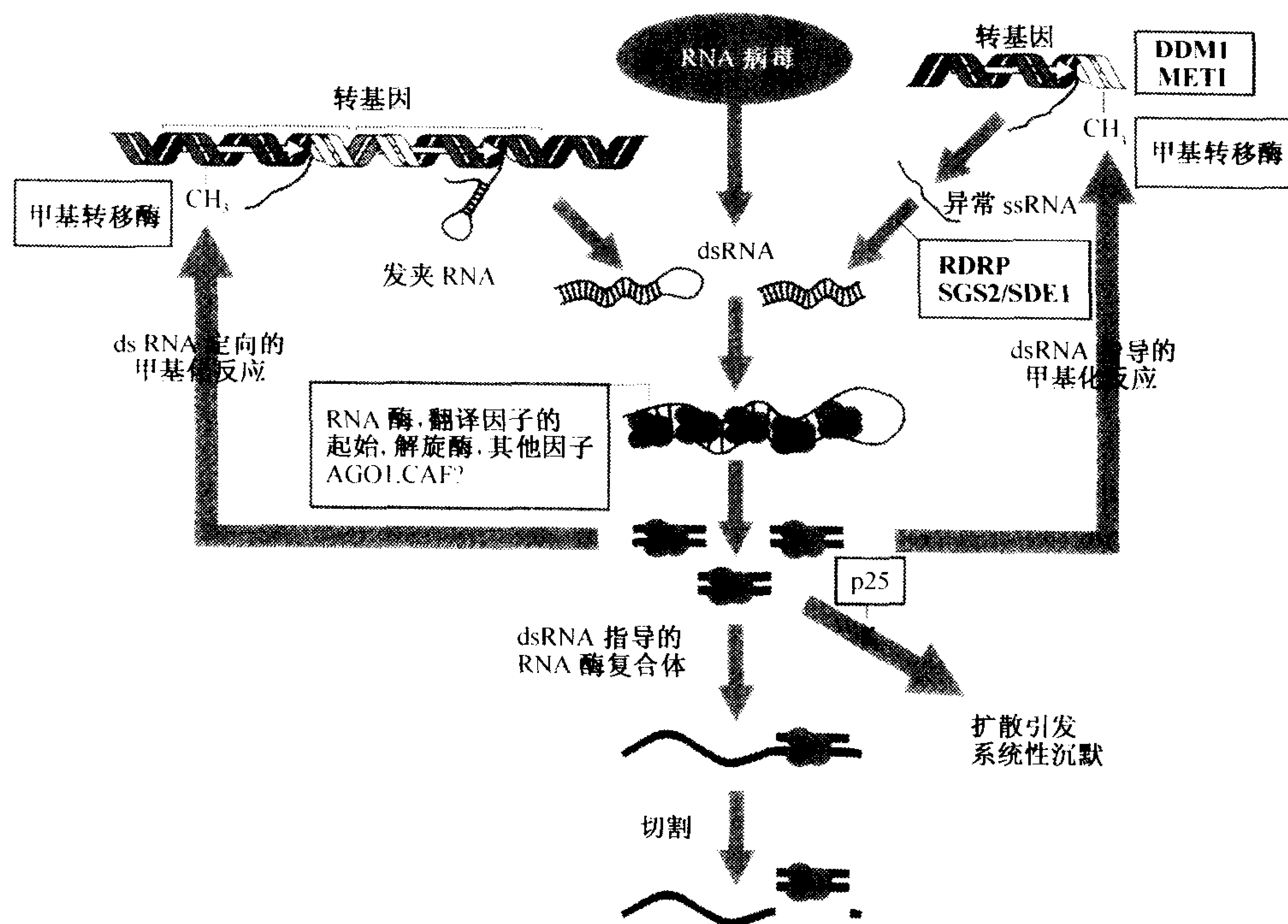


图 10.21 植物中参与 PTGS 的途径和基因的模型。dsRNA 可以以 3 种方式产生：反向重复序列整合进基因组中的两个转基因通过通读转录产生的发夹状（hairpin）RNA；RNA 病毒的复制型；或者寄主编码的 RdRp 以（通过某种异常方式产生的）ssRNA 为模板合成的产物。蛋白质复合物结合于 dsRNA 并将其切割成 22～25 nt 的短片段。这些 dsRNA 蛋白质复合物将含有相同序列的 ssRNA 切割成寡聚体。相同或经过修饰的复合物移动到细胞核中，在此处指导与寡聚体同源的 DNA 序列的甲基化，随后移动到其他细胞中传播这种 RNA 的降解机制并且在其细胞核中指导序列特异性的 DNA 甲基化。承蒙版权所有者（The American Association for the Advancement of Sciences）惠允，引自 Finnegan 等（2001）。

很可能有数个途径最终导致沉默事件的发生。马铃薯Y病毒属病毒（potyviruses）与黄瓜花叶病毒属病毒（cucumoviruses）对PTGS抑制作用的差异说明有数个途径通向RNA降解阶段。模式植物如拟南芥的诱变将会揭示涉及PTGS的途径和基因产物。然而，应该认识到，对其他科的植物而言，情况可能会有所不同。同样地，病毒抑制PTGS的机制看来有两种，而且以后很可能还会发现其他的机制。

利用病毒诱导基因表达的序列特异性抑制的能力（病毒诱发的基因沉默，或VIGS）为植物功能基因组学（functional genomics）提供了一个高通量（high throughput）的技术手段（Baulcombe，1999b）。

第Ⅴ节 其他因子的影响

大多数病毒时常突变以产生新的株系，这对其导致的病害可能有显著的影响（参见第17章）。一种病毒在一个特定寄主上产生的病害和它复制的程度有时受到第二种独立而且无关的病毒或细胞性寄生物（cellular parasite）侵染的显著影响。有关后者的影响下面将加以讨论。

A. 类病毒和卫星RNA

类病毒（viroid）和卫星RNA（satellite RNA）诱发病害的分子基础将在第14章（第Ⅰ节E与第Ⅱ节B部分）进行讨论。

B. 干扰缺损核酸

依赖于病毒的缺损性核酸（defective nucleic acid）在生物学上与卫星核酸（satellite nucleic acid）类似——它们为了复制和包裹（encapsidation）均需要辅助病毒（helper virus），但它们（缺损性核酸）是辅助病毒的缺失及（或）重组突变体，因而不同于卫星（Bruening，2000）。它们常与下列属的RNA病毒和DNA病毒相伴随：RNA病毒——苜蓿花叶病毒属（*Alfamovirus*）、雀麦花叶病毒属（*Bromovirus*）、长线病毒属（*Closterovirus*）、香石竹斑驳病毒属（*Carmovirus*）、黄瓜花叶病毒属（*Cucumovirus*）、马铃薯X病毒属（*Potexvirus*）、侵染植物的两个弹状病毒属、烟草花叶病毒属（*Tobamovirus*）、番茄丛矮病毒属（*Tombusvirus*）与番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）；DNA病毒——菜豆金色花叶病毒属（*Begomovirus*）与曲顶病毒属（*Curtovirus*）。

由于它们时常干扰其辅助病毒的复制，因此被称为缺损干扰（defective interfering，DI）核酸。DI颗粒（DI particle）和DI核酸的性质已作为病毒的错误复制在第8章（第Ⅸ节C）讨论过。植物中DI核酸的存在趋向于使病害的症状更温和（轻）。因此，Hillman等（1987）曾报道DI RNA起源于TBSV的一个培养物（图8.40）。在*N. clevelandii*中，TBSV独自可引起致死性的坏死，但是在将接种物中DI RNA的量逐渐增加后，导致的症状逐渐变轻，同时TBSV的增殖也相应减少。Ismail和Milner（1988）分离了SYNV的DI颗粒，其RNA的长度只有标准病毒的77%。包含该RNA

的粒子长度只有标准病毒粒体的约80%。它们本身无侵染性，但是，当与标准的病毒混合时，在 *N. edwardsonii* 上产生褪绿斑驳（chlorotic mottling），而非正常的明脉（vein-clearing）症状。ACMV 的 DI-DNA 干扰亲本病毒（parent virus）在 *N. benthamiana* 中的复制。在受侵染的植株中导致病毒复制减少、发病延迟而且症状弱化（symptom attenuation）（Stanley and Townsend，1985）。

C. 其他伴随核酸

对由粉虱传播的、诱发胜红蓟（*Ageratum conyzoid*）黄脉与棉花曲叶病病原的研究已经发现了3种DNA分子。其中之一与菜豆金色花叶病毒属病毒（begomoviruses）的DNA A相似，另一种DNA有卫星（DNA β）的特征，第三种DNA的特征显示它可能是DNA A和一种矮缩病毒属病毒（nanoviruses）之间的重组体（Stanley *et al.*，1997；Mansoor *et al.*，1999；Saunders and Stanley，1999）。虽然AYVV的DNA A可系统性侵染 *A. conyzoides* 和 *N. benthamiana*，但它不引起其寄主的症状。DNA A +β产生野生型症状，不受类似矮缩病毒属病毒的DNA存在的影响（J. Stanley，个人通讯）。据推测，其他明显为单组分的菜豆金色花叶病毒属病毒可能也具有相似的复杂病原学（etiology）。

D. 交互保护作用

交互保护是某病毒的一个株系在侵染一个寄主后使其得到的保护作用，以避免受到该病毒另一密切相关株系的侵染。McKinney（1929）证明了当烟草植株受到一种绿花叶病毒（TMV）的侵染后，再接种黄花叶病毒，而没有表现进一步的症状。Salaman（1933）发现用PVX的一个弱株系（mild strain）接种的烟草对后来用多个强株系（severe strain）的接种是免疫的，即使在第一次接种之后只有5天再接种也是如此。它们对不相关的病毒如TMV和PVY的侵染是没有免疫作用的。这种现象，也称为拮抗作用（antagonism）或干扰（interference），很快被证实在相关的病毒株系之间非常普遍。当第一个被接种的株系引起相当轻的系统性病害，而第二个株系导致局部坏死斑或一种严重病害时，这种现象最易于得到证实。这样的枯斑发展易于观察，而且可进行定量估计。相关株系间的干扰也可以通过将混合两种病毒的接种物接种到对一种或两种病毒或株系产生独特病斑（distinctive lesion）的寄主上得到证明。典型的TMV干扰另一个株系导致的黄色局部斑的形成如图10.22所示。

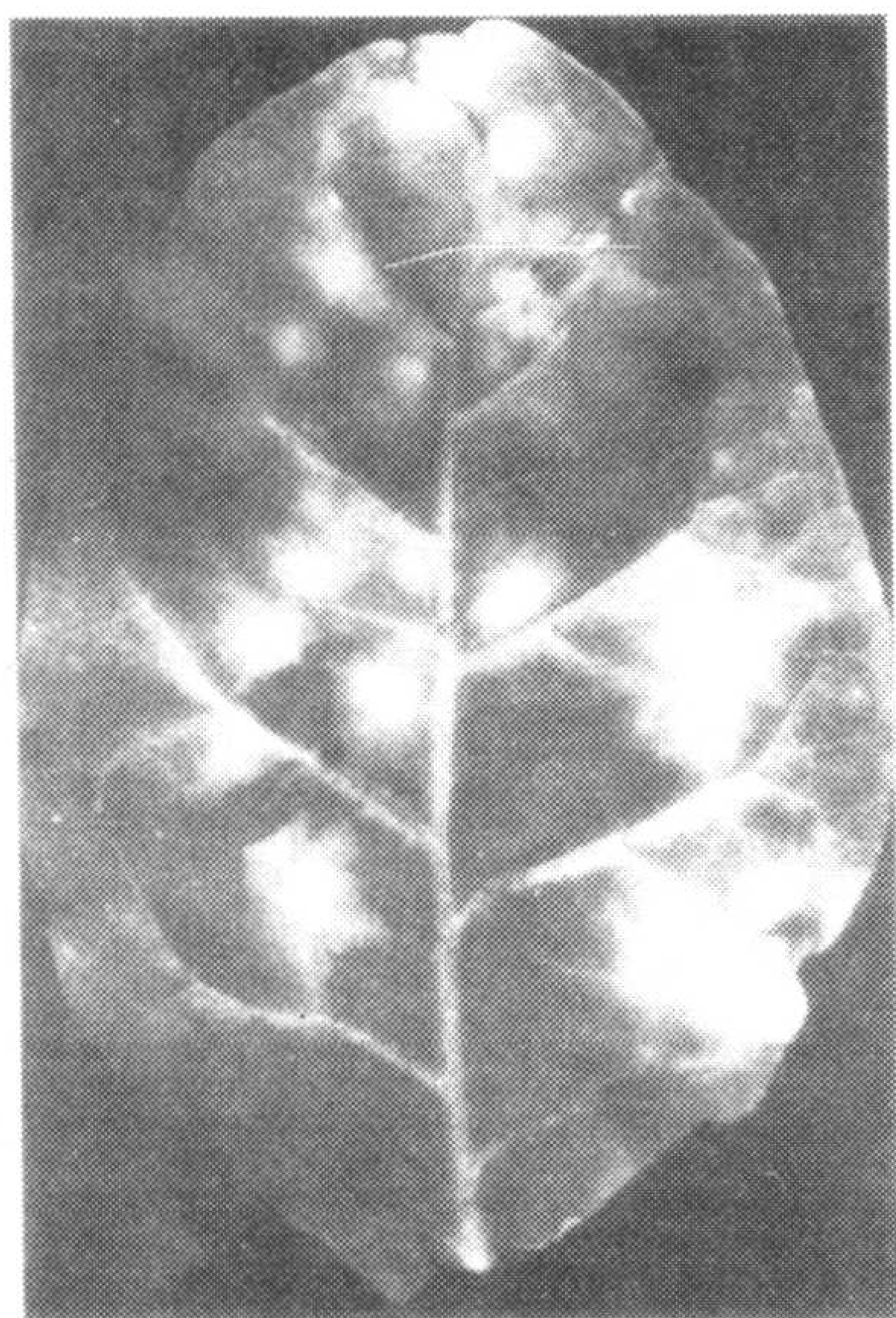


图10.22 用TMV的一种突变体株系接种后，烟草叶片上产生了缓慢变黄的大型局部斑。该分离株并非完全不含标准株系（不导致明显的局部斑）。与在叶片左下部的黄色（光亮处）的清晰边界呈现出一些区域，此处标准TMV已经复制并避免了受到黄色株系的侵入（承蒙B. Kassanis提供照片，谨致谢意）。

AMV 不同株系的粒体在其侵染的细胞中形成的聚集体（aggregation body）形态不同（参见第 17 章第Ⅱ节 C. 1. b）。Hull 和 Plaskitt（1970）用电子显微镜检查了 AMV 的两个株系之间的交互保护作用。当挑战（再接种）株系（challenging strain）与保护株系（protecting strain）同时接种或短时间（大约 4 h）之后接种时，两种聚集类型在相同的细胞中相邻共存。当保护和挑战两个株系在两次接种之间有较长的间隔（大约 7 h）时，存在于同一细胞中细胞质的不同部分；而若两次接种的间隔为大约 10h，则两种株系存在于不同的细胞中。只有通过回接到指示寄主（indicator host）上证明交互保护完全时，挑战株系的聚集体才不存在。

本书前一版中综述了当时已提出的交互保护的几种机制（Matthews，1991）。然而，最近对于植物病毒侵染诱发的基因沉默机制的认识（参见第Ⅳ节 A）为这种现象提供了一种更加合理的解释。Ratcliff 等（1999）已经提供了令人信服的证据，表明 PTGS 与一种烟草脆裂病毒属病毒（tobraviruses）和一种马铃薯 X 病毒属病毒（potexviruses）系统的交互保护有关。

弱株系的交互保护已被作为一种控制措施得以应用（第 16 章第Ⅳ节 A）。

E. 同时保护

同时保护（concurrent protection）是由于与一个保护病毒共接种导致挑战病毒的侵染率及（或）效价的降低，保护病毒在该寄主植物中不积累或诱导症状（Ponz and Bruening，1986）。豇豆 Arlington 品系在接种 CPMV 后不表现症状，而且不能检测到其侵染性或衣壳抗原的积累（Beier *et al.*，1977）。用 CPMV 与 CPSMV 共同接种 Arlington 品系减少了 CPSMV 诱发的病斑数目。用 CPMV 接种起源于 Arlington 的一个等基因系（isogenic line）也可保护它免于受到 CLRV 和 SCPMV 的侵染（Bruening *et al.*，2000）。该保护受到了 CPMV RNA 1 的激发。

F. 不相关病毒之间的相互作用

1. 完全依赖其他病毒引起病害

对一些病毒组合（virus combination）而言，一种病毒的复制完全依赖于另一种病毒。这种依赖性病毒（dependent virus）称为卫星病毒（satellite virus），将在第 14 章（第Ⅱ节 A）中详述。

2. 不完全依赖其他病毒引起病害

这种情况通常存在于（与田间的一种已知病害相伴随的）两种病毒间。例如，水稻的很重要的东格鲁病（tungro）通常由 RTBV 与 RTSV 联合引起，前者是一种复制需经过反转录的（reverse transcribing）DNA 病毒，而后者为一种 RNA 病毒（Anjaneyulu *et al.*，1994）。RTSV 自身由水稻绿叶蝉（二点黑尾叶蝉）传播，但不导致症状。RTBV 引起水稻的严重症状，但是未发现单独传播这种病毒的介体；它需要 RTSV 的存在来由叶蝉传播（参见第 2 章第Ⅲ节 A. 6）。因此，在这种复合病害（disease com-

plex）中，RTSV的作用在于传播而RTBV的作用主要在于诱发产生症状。如果不是全部，大部分幽影病毒属病毒（umbraviruses）伴随着黄症病毒属病毒（luteoviruses），后者为它们提供昆虫传播的机会（参见第11章第Ⅲ节H.1.a）。

一个更复杂的系统是花生丛簇病（groundnut rosette disease），它包括3个因子：幽影病毒属病毒（GRV）、黄症病毒属病毒（GRAV）和一种卫星RNA（GRV sat-RNA）。该卫星RNA是导致症状的主要因素（Murant *et al.*，1988a；Murant and Kumar，1990），而且它和GRAV二者均为蚜虫传播所必需的（Murant，1990）。GRAV的外壳蛋白包裹它自己的基因组以及GRV和sat-RNA的基因组，卫星RNA的存在对于包裹是不可缺少的（Robinson *et al.*，1999）。

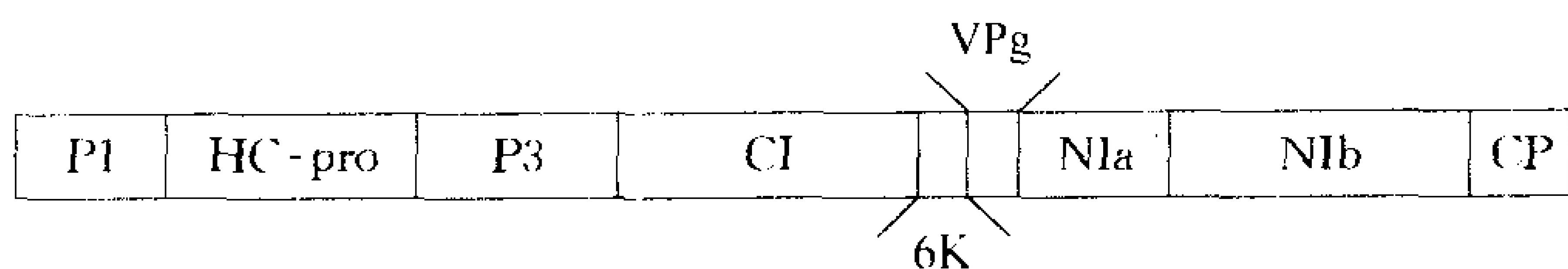
3. 对局部斑数目的影响

Thomson（1961）发现，当PVX与TMV或PVY一起在烟草叶上接种时，PVX导致的枯斑更多。增加的程度差别很大，依据环境条件的不同，变化范围为2～80倍。从稀释和变更两种病毒比例的效应研究中，Close（1962）得出结论认为TMV对PVX枯斑形成的最大刺激来自于接种物中TMV的特定浓度，而非取决于两种病毒量的比例。这可以由病毒对PTGS的抑制来解释（参见第Ⅳ节F）。

4. 对病毒复制的协同效应

PVX和PVY混合侵染烟草植株的特征是在最初系统侵染的叶片上叶脉发生严重坏死。表现这种协同反应的叶片含有的PVX量最高，时达单独侵染的10倍，但PVY的量与单独侵染时相同（Stouffer and Ross，1961）。超微结构研究和荧光抗体染色（fluorescent antibody staining）表明这两种病毒在同一个细胞中复制，而且PVX产量的提高是由于每个细胞中病毒增殖量的增加，而非支持PVX复制的细胞数目的增加（Goodman and Ross，1974a）。在双重侵染的组织中，PVX负链RNA增加的水平与正链RNA增加的水平不成比例，说明在病毒复制期间协同作用涉及了两种极性RNA链的相对水平正常调控的改变（Vance，1992）。TVMV、TEV和PepMoV也与PVX产生协同反应（Vance *et al.*，1995），而且马铃薯Y病毒属病毒和不相关病毒的各种其他组合有协同的相互作用。VICMV和CMV的联合侵染引起豇豆矮化（Anderson *et al.*，1996），而玉米致死性坏死（lethal necrosis）是玉米褪绿斑驳病毒属病毒（machlomoviruses）MCMV与马铃薯Y病毒属病毒MDMV或SCMV联合侵染的结果（Scheets，1998）。马铃薯Y病毒属病毒SPFMV和毛形病毒属病毒（criniviruses）SPCSV的联合侵染导致甘薯（*Ipomoea batatas*）的严重症状，然而这两种病毒的单独只引起轻微症状（Karyeija *et al.*，2000）。在所有这些情况中，马铃薯Y病毒属病毒的浓度与单一侵染的类似，而另一种病毒的浓度却显著增加；在甘薯复合病害中，SPCSV均被限制于韧皮部。然而，玉米致死性坏死也可由MCMV与黑麦草花叶病毒属病毒（rymoviruses）WSMV的联合侵染所引起（Scheets，1998）。在这种情况下，两种病毒的浓度均因双重侵染而提高。

为了确定马铃薯Y病毒属病毒基因组的哪一个区域提高了PVX的增殖，Vance等（1995）接种了表达TEV基因组各个区域的转基因烟草植株（图10.23）。协同反应只是



转基因系	TVMV 基因	Km 分离比	蛋白质水平	协生作用
1	外壳蛋白（CP）	98∶1	0.30%	-
2	外壳蛋白（CP）	65∶22	0.25%	-
3	CI	66∶26	0.15%	-
4	CI	64∶22	0.10%	-
5	NIa	73∶22	≠	-
6	NIa-glnH	59∶20	0.20%	-
8	CI-6K-NIa-NIb-CP	*	0.02%	-
9	CI-6K-NIa-NIb-CP	*	0.02%	-
10	P1-(HC-Pro)-P3	40∶1	1%	+
11	P1-(HC-Pro)-P3	2∶1	1%	+

图 10.23　表明单个基因定位的 TVMV 多聚蛋白示意图以及 TVMV 转基因系清单（列出了含有各个基因的构建物、通过卡那霉素筛选测定的转基因的分离特征以及植物叶片中编码基因产物的蛋白质水平）。Km，卡那霉素；CI，细胞质内含体蛋白；NIa，细胞核内含体蛋白 a；glnH，*E. coli* 谷氨酰胺结合蛋白；NIb，细胞核内含体蛋白 b。* 表示这些种子为纯合子并且不分离（在卡那霉素筛选平板上测定）。≠ 表示没有适宜的抗体可用于该测定。转基因系 1～9 的表达水平的百分率（来自转基因的蛋白质/可溶性总蛋白）。a 表示转基因系 10 和 11 的表达水平的百分率（转基因的表达与野生型病毒侵染相比较）。在所有情况下，所种植的用于确定转基因表达水平的植株与来自用于研究与 PVX 的协同作用所用植株的种子均属于同一代。承蒙惠允，引自 Vance 等（1995）。

在表达 P1-(HC-Pro)-P3的植株中存在。这一区域也提高了 CMV 与 TMV 的复制，而对这 3 种复制水平提高的病毒而言，HC-Pro 蛋白的表达是协同作用所必需的（Pruss *et al.*，1997）。对马铃薯 Y 病毒属病毒 HC-Pro 抑制寄主基因沉默防卫机制（第Ⅳ节 H）的认识表明协同作用可能是由于减少了寄主对另一个病毒复制的抑制。

令人瞩目的协同效应也发生于受 BRNV 侵染的草本寄主中。在与南方菜豆花叶病毒属病毒（sobemoviruses）SNMoV 的混合侵染中，该悬钩子病毒（BRNV）在正常情况下非常低的浓度增加了 1000 倍（Jones and Mitchell，1986）。在水稻东格鲁病方面，RTSV 的存在增强了由 RTBV 所引起的症状。与马铃薯 Y 病毒属病毒的协同作用不同，RTBV 或 RTSV 在联合侵染时与单一侵染相比，病毒的增殖没有显著增强（F. Sta Cruz，O. Azzam and R. Hull，未发表的资料）。

卫星核酸的存在可降低或提高辅助病毒的复制与症状表现程度（参见第 14 章第Ⅱ节 B.5）。

5. 对病毒移动方面的影响

如第 9 章（第Ⅱ节 D.6）所述，一种病毒在某特定寄主中的侵染和系统性移动可能允许一个不相关的、正常情况下不能从该寄主的最初侵染的细胞移动的病毒发生细胞间和系统性移动。同样地，一种完全系统性侵染的病毒能（通过互补）协助限制于某种组织（如韧皮部）的病毒从该组织中移动出去。

6. 对病害宏观症状的影响

比较常见的情况是，两种病毒的混合侵染导致比一种病毒单独侵染更严重的病害。这种协同效应的经典例子是上述烟草中 PVX 与 PVY 的混合侵染产生严重的脉坏死而不是任一病毒单独侵染导致的比较轻的斑驳或镶脉（vein-banding）症状（Smith，1931）。在许多马铃薯品种中，这两种病毒一起产生“皱缩花叶”（rugose mosaic）比任一病毒单独侵染导致的病害更严重。ToMV 的许多株系在番茄上只产生花叶病，但是在与 PVX 的组合中，一种严重的“条斑”（streak）病随之发生而且通常使植株死亡。PVY 和类病毒 PSTVd 的双重侵染在田间引起一些马铃薯品种的严重坏死病害（Singh and Somerville，1987）。

分离的原生质体已用于研究混合侵染。例如，Otsuki 和 Takebe（1976a）曾用 TMV 与 CMV 接种烟草叶肉细胞的原生质体。70%～80%的原生质体支持了这两种病毒的复制，但没有任何协同或拮抗效应。另一方面，在 BMV 与 CCMV 对烟草原生质体的混合侵染中，产生了两种类型的病毒粒体，但是只有 BMV 的粒体具有侵染性。在混合侵染中只有 CCMV 的 RNA 3 得以合成（Sakai *et al.*，1983）。

7. 混合侵染对细胞学的影响

导致坏死的混合侵染对单个细胞一定有显著的影响。在不发生细胞死亡的混合侵染中，两种不同的病毒可以在相同细胞中复制，产生特征性内含体或病毒粒体的阵列，而没有任何显著的相互干扰的迹象（Poolpol and Inouye，1986；Langenberg，1987）。

G. 病毒和真菌间的相互作用

1. 病毒侵染对真菌病害的影响

a. 抗性增强

田间观察和温室测试已经表明致病疫霉（*Phytophthora infestans*）对已受某种病毒侵染的马铃薯植株的侵染发展较慢（Müller and Munro，1951）。很多其他例子也说明，病毒的侵染可降低寄主植物对真菌和细菌寄生物的感病性。例如，一个过敏性反应的烟草品种受到 TMV 侵染后诱发了对寄生疫霉（*Phytophthora parasitica*）、寄生霜霉（*Peronospora parasitica*）和烟草假单胞菌（*Pseudomonas tabaci*）的系统性持久抗性（McIntyre *et al.*，1981）。同样地，对黄瓜炭疽病的系统性抗性通过 TMV 的接种得以诱发（Jenns and Kuc，1980），烟草对烟草霜霉（*Peronospora tabacina*）的抗性（Ye *et al.*，1989）以及对菊科白粉菌（*Erysiphe chicoracearum*）的抗性也是这样诱发的（Marte *et al.*，1993）。对菊科白粉菌（*E. chicoracearum*）的保护与 TMV 侵染诱发的对富羟脯氨酸糖蛋白（hydroxyproline-rich glycoprotein）的积累相关（Raggi，1998）。

这种抗性的发展或许涉及了在第Ⅲ节（K.1 部分）中讨论过的 PR 蛋白。杀菌剂化合物的确已经从受病毒侵染表现坏死反应的植物中分离出来（Burden *et al.*，1985）。在其他一些病毒-真菌的相互作用中可能并未涉及一般化的防卫反应。因此，BYMV 对蚕豆的侵染减少了后来用蚕豆单胞锈菌（*Uromyces viciafabae*）接种的叶片上孢子堆

(pustule) 的密度。表现黄化症状的叶片变化最为显著 (Omar *et al*.、1986)。

b. 感病性提高

Russell (1966) 证明田间的甜菜植株在受到 BMYV 的侵染后，对链格孢属 (*Alternaria*) 侵染的感病性大幅度提高。而 BYV 没有这样的影响。BMYV 提高了，而 BYV 降低了对另一种真菌　　蓼白粉菌 (*Ersiphye polygoni*) 的感病性。受这两种病毒侵染的植物与健康的植物有同样的感病性。相互作用的精确程度依赖于寄主植物的遗传组成 (genetic constitution) 和环境条件。受病毒侵染后对真菌的感病性提高的许多其他的例证已经有报道。例如，在小麦或大麦受到 BYDV 的侵染后更易于受到枝孢属 (*Cladosporium* spp.) 和轮枝孢属 (*Verticillum* spp.) 真菌的侵染。在受到 MDMV 侵染的玉米叶上，玉蜀黍长蠕孢 (*Helminthosporium maydis*) 的产孢时间较早，并且叶片上的病斑更多 (Stevens and Gudauskas, 1983)。受到 AV-2 侵染的芦笋 (asparagus) 对镰刀菌属 (*Fusarium*) 真菌导致的冠腐与根腐的感病性增加 (Evans and Stephens, 1989)。

2. 真菌侵染对病毒感病性的影响

锈菌的侵染可能会大幅地提高叶片对一些病毒的感病性 (Yarwood, 1951)。例如，先用菜豆单孢锈菌 (*Uromyces phaseoli*) 的夏孢子接种 pinto 菜豆叶片的半叶上，然后用 TMV 接种在整个叶片上。随后对 TMV 的定量估计表明，在发生锈病的半叶上病毒的侵染性是非生锈病半叶上的近 1000 倍。锈菌的侵染部分地抑制了可见坏死斑的发展。这种对坏死斑发展的抑制作用使我们不可能确定病毒含量的增加究竟是由于成功进入点 (entry point) 数目的增加，还是病毒增殖的增加，或者是由于这两个因素的结合造成的。

其他的真菌可能诱导对病毒侵染的抗性或明显的抗性。已经在茎中被注射了烟草霜霉 (*Peronospora tabacina*) 孢子悬浮液的珊西烟植株在 3 周之后接种 TMV，产生了更少、更小的局部坏死斑 (Mandryk, 1963)。真菌根串珠霉 (烟草黑腐病菌) (*Thielaviopsis basicola*) 引起烟草的局部坏死斑。Hecht 和 Bateman (1964) 发现，如果烟草植株的下部叶片被这种真菌侵染，则上面的叶片变得对 TNV 或 TMV 的侵染有抗性，这种抗性是根据病毒性坏死斑的大小来判断的。用炭疽菌 (*Colletotrichum lagenarium*) 或假单胞菌 (*Pseudomonas lachrymans*) 接种黄瓜，在其上面的一片叶上诱发了对 CMV 的系统性抗性 (Bergström *et al*., 1982)。其中一些在一定距离发生的抑制性效应可能是由于 SAR，也可能是由于在第Ⅲ节 K 部分讨论过的诱发病程相关 (PR) 蛋白。另一方面，来自大伯疫霉 (*Phytophthora megasperma*) 的一种葡聚糖制剂 (glucan preparation) 保护了许多烟草属植物免受一些病毒的侵染，但没有诱发病程相关蛋白 (Kopp *et al*., 1989)。

3. 病毒侵染对非介体昆虫的影响

TMV 侵染的番茄提高了 Colorado 马铃薯甲虫幼虫存活的机会 (Hare and Dodds, 1987)。据认为，病毒侵染可能促进植食性 (phytophagous) 昆虫对“边缘性” (marginal) 寄主植物种的适应。

4. 病毒侵染和空气污染物间的相互作用

人们日益关心空气污染物（如臭氧）对植物生长的影响。已经有一些关于病毒侵染对臭氧损害叶片严重度影响的调查研究。对大多数寄主-病毒组合而言，病毒侵染减少了空气污染物的损害。例如，TMV的侵染烟草叶片使因臭氧导致的损害从11%降低到了5%（Bisessar and Temple，1977）。在温室和大田试验中都观察到了这种效应。次急性剂量（subacute dose）的二氧化硫引起菜豆中的SBMV与玉米中MDMV的含量小幅度但持续地增加（Laurence *et al.*，1981）。

第Ⅵ节　讨论

病毒进入一个未受侵染的植物细胞的结果取决于两种（病毒的和植物的）基因组间的相互作用。这些基因组的活性可能受到某些影响，如环境、植物的生长阶段、病毒进入的位点以及其他病原的影响。

在病害诱发过程中，病毒与寄主基因之间的相互作用目前是生物学上最有趣、实际应用方面最重要的植物病毒研究领域之一。定点诱变、转基因植株、非破坏性的荧光探针以及体外（*in vitro*）或原生质体系统，有时还用完整植株等技术，能够鉴定一种基因产物的主要功能或多种功能，如确定它是一个复制酶或一个蛋白酶。然而，为了研究病害的诱发必须利用完整的植株或植株的某些部分（器官），而且需要研究病毒的一个完整的复制周期。由于这些原因，前面可能还会遇到各种突出的困难。

那些涉及病害诱发的病毒基因的一些蛋白质产物在植物（in planta）中作用的研究可能非常困难，其中一些原因包括：

（1）蛋白质可能是以非常低的浓度存在，因为在每个细胞中一种病毒专化性的蛋白质只需几个分子即可对寄主细胞的一些功能加以阻断或解除抑制（derepress）。

（2）很可能这样的蛋白质会在受侵染的细胞中短期（相对于病毒完成合成所需的时间）存在。

（3）病毒专化性多肽可能只是在细胞内形成的（病毒所利用的）活性分子的一部分。

（4）病毒专化性多肽可能只有在原位（*in situ*）（如在某个特定细胞器的膜中）才有生物学活性。

如第Ⅲ节所述，许多病害的宏观症状可能是由于病毒复制导致的出人意料的副作用引起的。下面的假说性例子描述了这种可能性。现在以TEV所编码的NIa蛋白为例（Carrington and Dougherty，1988）。作为底物识别信号的氨基酸序列已经被鉴定。在正常条件下的一般寄主中，该蛋白酶能在受侵染的细胞里积累到很高的水平而不引起细胞的死亡。这肯定意味着该蛋白酶不会显著地耗竭寄主的任何关键蛋白质的量。假如我们换成另外一种寄主，或换成不同的环境条件。在新的情况下，一些寄主编码的对细胞功能非常必要的蛋白质可能对切割是敏感的，结果会导致产生一个新的病害形式。在这样的环境条件中，可能难于鉴定所涉及的所有寄主蛋白质及其功能。在试图理解病害诱发的分子基础时，最好首先将精力集中于那些已知是病毒复制或病毒在细胞间移动的直接

结果或所必需的效应上。

虽然分子技术无疑将会继续增进我们对病害诱发过程中病毒基因作用的理解，但是正在出现各种困难。例如，定点诱变作为一项强有力的技术仍有一些局限：①碱基序列变化的可能的排列（permutation）和组合（combination）的数目是巨大的。②当需要一个完整的侵染循环时，很难找到对病毒是非致死的变化。③因为 RNA 病毒的高突变率和重组的存在（参见第 17 章），必须时常检查基因工程突变体培养物的碱基全序列，以确定自发的变化未导致回复到最初的序列或未以其他方式改变了的序列。④一种困难可能是，当对某特定病毒进行逐渐深入细致的实验时，会发现大部分或所有的病毒基因可能都在不同方面参与了病害的诱发。

正在建立的基因组研究的新技术应当为阐明寄主对病毒侵染反应的细节提供有力的工具。这些新技术不但将会增进我们对病毒病抗性的理解（Michelmore，2000），而且它们会提供感病情况下的信息。例如，真菌病原芸薹生链格孢（*Alternaria brassicicola*）侵染的拟南芥（虽然属于一种不亲和的情况）的微阵列分析（microarray analysis）揭示了 705 种寄主 mRNA 的稳态丰度（steady-state abundance）的实质变化（Shenk *et al.*，2000）。

人们根据植物对一种病毒接种的反应，将其描述为免疫的（immune）或可侵染的（infectible）。如果一种植物表现为免疫，它就被认为是该病毒的非寄主（non-host），因而该病毒不能在完整植株的任何细胞或分离的原生质体中复制。这种极端的抗性已在第Ⅲ节 A 中详细地讨论过。

就可受侵染的植物种或品种而言，病毒能在其分离的原生质体中侵染并复制。植株对于侵染可能是抵抗的，或者是易感的。直到最近，才认识到有两种类型的抗性。对包括阈下侵染的抗性而言，病毒增殖局限于最初侵染的细胞中，因为病毒编码的、用于病毒细胞间移动的蛋白质在特定寄主中是非功能性的（nonfunctional）。在过去，属于这一类型抗性的许多例子被描述为免疫性的。就第二种类型的抗性而言，一般认为寄主的反应将病毒的侵染限制于最初侵染的细胞周围的一个区带中，通常造成局部坏死斑（necrotic local lesion）。围绕这些枯斑的未受侵染的组织对侵染变得有抗性。这叫做获得性抗性（acquired resistance）。

然而，现在已经识别出至少两种形式的寄主反应：专化性抗性反应（specific resistance response）和一般化抗性反应（generalized resistance response）。专化性抗性反应受到一个或多个寄主基因的控制，其产物与病毒的某些决定因素相互作用并限制病毒从初始的侵染点传播出去。这种限制通常是通过 HR 实现的。一般化的抗性是植物积累起来的针对"外源"核酸的抗性，就病毒而言，它通常是借助 PTGS 而发挥作用（第Ⅳ节）（Covey，2000；Ding，2000）。这种特异性反应导致的遏制很有可能并不总是通过 HR，有时可能是通过某种确实产生一种可见症状的机制。

在某特定植物中不引起系统性病害的病毒对那种植物而言称为非致病性的（nonpathogenic）。如果一种病毒或病毒株系引起一个特定种或品种的系统性病害，它就是致病性的（pathogenic）。将一个抗性基因导入这样一个易感病的种或品种中，可能会使相应的病毒变得无毒（无致病性）（avirulent）。然而，病毒可能会发生突变，从而克服寄主的抗性并变成一个致病株系（virulent strain）。因此，寄主和病毒的基因间相互作

用决定接种的结果。从一无毒的变成一个有致病力的病毒株系可能只涉及在一个病毒编码的蛋白质中一个单一氨基酸的变化（例子见第Ⅲ节 A～E）。

在易感的植物种或品种中，病毒进行复制并系统性移动。就敏感的反应（sensitive reaction）而言，病害随之发生。如果该植物是耐病的，则对植物没有明显的影响，从而引起潜伏侵染。对一个易感的植物而言，侵染的结果是由寄主和病毒二者的基因决定的。例如，TMV 外壳蛋白基因中一个单一碱基的变化可能足以改变其所导致病害的性质。

鉴于这些寄主对病毒侵染的反应方面新的研究结果，有必要改变我们对导致建立病毒完全系统性侵染的事件的观念。如果病毒不是被极端的抗性或一个局部的过敏性反应所遏制，或它克服了 HR，侵染的结果就取决于病毒克服寄主的一般化抗性反应的"攻击力"。目前已经发现一些病毒编码抑制一般化 PTGS 防卫的基因（见第Ⅳ节 H），而且已经识别出在侵染过程中不同时间起作用的两种基本系统。今后很可能会发现其他的病毒基因也可抑制 PTGS，并且将会证明存在着抑制过程的其他变化。然而，就其他病毒如 PVX 而言，尚未发现 PTGS 抑制系统，并且据认为病毒的迅速增殖和传播可能克服了寄主的防卫反应。

如早前所述，许多环境因素可影响侵染和发病的进程。这些因素包括包括光照、温度、水分供应、营养以及在生长季节期间这些因素之间的相互作用。当植物受到两种不相关病毒或一种病毒和一种细胞病原（cellular pathogen）的复合侵染时，复杂的相互作用就可能发生。像这样的因素会影响植物或病毒的基因组或两者的表达，因此，侵染的结果取决于特定的环境条件。

涉及病害症状的诱发方面的实际过程尚不太清楚。对于特定病毒的株系，我们应该对一种症状的严重度和不同的症状表型加以区分。

所涉及的许多生物化学变化可能并不直接与病毒复制相关联。矮化（stunting）或许涉及生长激素平衡的改变。病毒侵染的叶片上花叶图式（mosaic pattern）的形成涉及在叶片个体发生（ontogeny）的早期阶段所发生的事件。

第11章　传播（传染）方式Ⅰ：无脊椎动物、线虫和真菌介体

第Ⅰ节　导言

我们可以设想病毒在一种长寿的树木上能够存活数百年。然而，作为专性寄生物（obligate parasite），病毒为了存活通常需要从一个感病的个体传播到另一个个体上。了解病毒在植物之间的传播方式很重要，原因如下：

（1）从实验的角度来看，只有通过某种途径将病毒传播到健康的植株上，并使病害重现，才能认为该病害是由病毒引起的。

（2）只有在作物间传播相当迅速的病毒才是经济上比较重要的病毒。

（3）了解病毒在田间的存在及传播方式对采取合理的防治措施是必需的。

（4）无论从科学的角度，还是在建立新的病毒防治方法方面，病毒与其无脊椎动物、真菌传播介体之间的相互作用都是很有意义的。

（5）某些传毒方法，尤其是机械传播，对在实验室中有效地研究病毒非常重要。

病毒不能穿透完整的植物表皮角质层（cuticle）和纤维素细胞壁，这个问题的克服可以通过避免穿透完整外表面来实现（如种传或通过营养体繁殖传播），也可以通过植物表面形成的伤口侵入（如通过机械摩擦或由昆虫传播）。任何一种病毒的自然传播机制都有很多方面的特异性（参见附录3）。本章讨论病毒的生物介体如何传播病毒。下一章将论述病毒的机械传播和种子传播，以及病毒如何通过农作物和自然群体来传播。

第Ⅱ节　通过无脊椎动物的传播

在自然界许多植物病毒在植株之间的传播是通过无脊椎动物（invertebrate）来实现的（见附录3）。在无脊椎动物的约22个门中，只有3个门拥有许多成员取食绿色陆生植物。它们是节肢动物的单肢门（Uniramia）、甲壳门（Crustacea）以及线虫门（Nematoda）。节肢动物的两个门和线虫门都包含有植物病毒介体。另外两个门——环节动物门（Annelida）和软体动物门（Mollusca）的一些成员也以植物为食，它们之中也可能有潜在的严格机械传播类型的介体。

A. 节肢动物（Arthropoda）

本书采用的是Webb等（1978）以及Richards和Davies（1994）的分类系统。在单肢门中，昆虫纲的一些成员以绿色陆生植物为食；甲壳门的一个纲，即蛛形纲的有些成员也取食活着的绿色陆生植物。这两个类群均包含一些病毒介体。

1. 昆虫纲（Insecta）

在昆虫纲现有的29个目中有9个目的昆虫以绿色陆生植物为食，因此是病毒的潜在介体。目前已知的各类病毒介体昆虫的大概数目（括号中的数字）如下：

（1）弹尾目（Collembola）——咀嚼式昆虫；有些以绿色植物为食（0）。

（2）直翅目（Orthoptera）——咀嚼式昆虫；有些以绿色植物为食（27）。

（3）革翅目（Dermaptera）——咀嚼式昆虫；有些以绿色植物为食（1）。

（4）鞘翅目（Coleoptera）——咀嚼式昆虫；许多以绿色植物为食；见表11.1列出的介体。

（5）鳞翅目（Lepidoptera）——咀嚼式昆虫；许多幼虫以绿色植物为食（4）。

（6）双翅目（Diptera）——一些幼虫以绿色植物为食（2）。

（7）膜翅目（Hymenoptera）——一些幼虫以绿色植物为食（0）。

（8）缨翅目（Thysanoptera）蓟马（thrips）——有些以锉吸方式取食植物（10）。

（9）半翅目（Hemiptera）——通过吸吮方式取食绿色植物。
盲蝽科（Miridae）和皮蝽科（Piesmatidae）（～4）。

（10）同翅目（Homoptera）*，见表11.1。

表 11.1 同翅目和鞘翅目中的植物病毒介体

目、亚目、科	普通名称（昆虫组群）	科内种类	介体种数	传播的病毒数
同翅目（Homoptera）				
头喙亚目（Auchenorrhyncha）				
蝉科（Cicadidae）	蝉（cicada）	3200	0	0
角蝉科（Membracidae）	角蝉（treehopper）	4500	1	1
沫蝉科（Cercopidae）	沫蝉（spittlebug）	3600	0	0
叶蝉科（Cicadellidae）	叶蝉（leafhopper）	15 000	49	31
蜡蝉总科（Fulgoroidea）	飞虱（planthopper）	19 000	28	24
胸喙亚目（Sternorrhyncha）				
木虱科（Psyllidae）	木虱（psyllid）	2000	0	0
粉虱科（Aleyroididae）	粉虱（whitefly）	1200	3	43
蚜科（Aphididae）	蚜虫（aphid）	4000	192	275
粉蚧科（Pseudococcidae）	粉蚧（mealybug）	6000	19	10
鞘翅目（Coleoptera）				
叶甲科（Chrysomelidae）	叶甲（leaf beetle）	20 000	48	30
瓢甲科（Coccinellidae）	瓢虫（ladybird beetle）	3500	2	7
象甲科（Cucurlionidae）	象鼻虫（weevil）	36 000	10	4
芫菁科（Meloidae）	芫菁（blister beetle）	2100	1	1

承蒙惠允，引自Nault（1997）。

* 原文为本翅目中的同翅亚目，为保持本章前后名称一致此处改为同翅目——译者注。

以上列出的前 7 个目都是咀嚼式昆虫，这些目的代表以幼虫或成虫，或两者均可取食绿色植物。在直翅目、革翅目以及鳞翅目和双翅目的幼虫中已经发现一些严格机械式的介体。除几种病毒外，这些目中的介体均不重要。一些重要的介体昆虫属于鞘翅目中。弹尾目和膜翅目中包含几种农作物的普通害虫，它们中可能有些是潜在介体。缨翅目包含一个主要类群植物病毒的介体种类。就数量而言，同翅目是最重要的植物病毒介体类群。关于同翅目内部的分类还有一些争议（Campbell *et al.*，1995）。

2. 蛛形纲（Arachnida）

这个纲的 12 个目中只有一个目，即蜱螨目（Acari）（螨类和蜱类）的一些成员取食绿色陆生植物。蜱螨目有 4 个科以绿色植物为食：叶螨科（Tetranychidae）、跗线螨科（Tarsonemidae）、瘿螨科（Eriophyidae）和粉螨科（Acaridae）。已知在瘿螨科中存在病毒介体，叶螨科中可能也有。

B. 线虫门

线虫门有 10 个目（Goodey，1963）。寄生于绿色植物的线虫大都属于垫刃目（Tylenchida），但在这个目中尚未发现病毒介体。迄今为止仅在矛线目（Dorylaimida）* 中发现了几种寄生于植物的传毒介体。

C. 植物病毒和无脊椎动物之间的关系

病毒通过无脊椎动物在植物之间传播从两方面而言是很有意义的。首先，这些介体为许多引起巨大经济损失的病毒在田间的传播提供主要途径。其次，介体和病毒之间的关系具有很大的生物学和分子意义，尤其是有些病毒可以在介体体内增殖，这些病毒即可被作为植物也可被作为动物病毒。即使对那些不能在介体动物体内增殖的病毒而言，它们之间的关系也不仅仅只是病毒在动物的外表面被动传播。通过无脊椎介体的传播是在环境条件影响下，病毒、介体和寄主植物之间特异性互作的一种现象。本章将讨论病毒介体的类群，并概述已发现的病毒和介体之间的各种关系。在第 12 章将讨论介体与病毒的生态学之间的关系，介体与病害防治相关的内容将在第 16 章中讨论。

在一般情况下，通过某一类型介体传播的病毒就不再通过其他介体传播。这种专化性不仅存在于介体的类型如科、属或种的水平上，而且在生物型（biotype）的水平上也存在。病毒与其生物介体之间的基本互作可分为两种：①一些可以存在于介体的体内，称为内传型（internally borne）或循回型（circulative）；②有些病毒的传播不经过介体的体内，称为外传型（externally borne）或非循回型（non-circulative）（Hull，1994；Gray，1996）。病毒-介体之间的关系在昆虫，尤其是蚜虫方面已经有了很详细的研究，这些关系的基本特征将在第Ⅲ节 D 部分中讲述。

---

* 在新的线虫分类系统中，从矛线目分出的三矛目中也有病毒介体线虫——译者注。

第Ⅲ节　蚜虫（蚜科 Aphididae）

A. 蚜虫的生活史与取食习性

在昆虫中，蚜虫进化成为取食高等植物的最成功的代表，尤其是在温带植物群中。因此它们发展成为最重要的一群病毒介体并不足为奇。

1. 生活史

在温和的环境中，蚜虫在第一寄主（primary host）和第二寄主（secondary host）之间频繁交替（转主）活动。它们可产生多种不同的形态类型，其完整的生命周期见图 11.1。

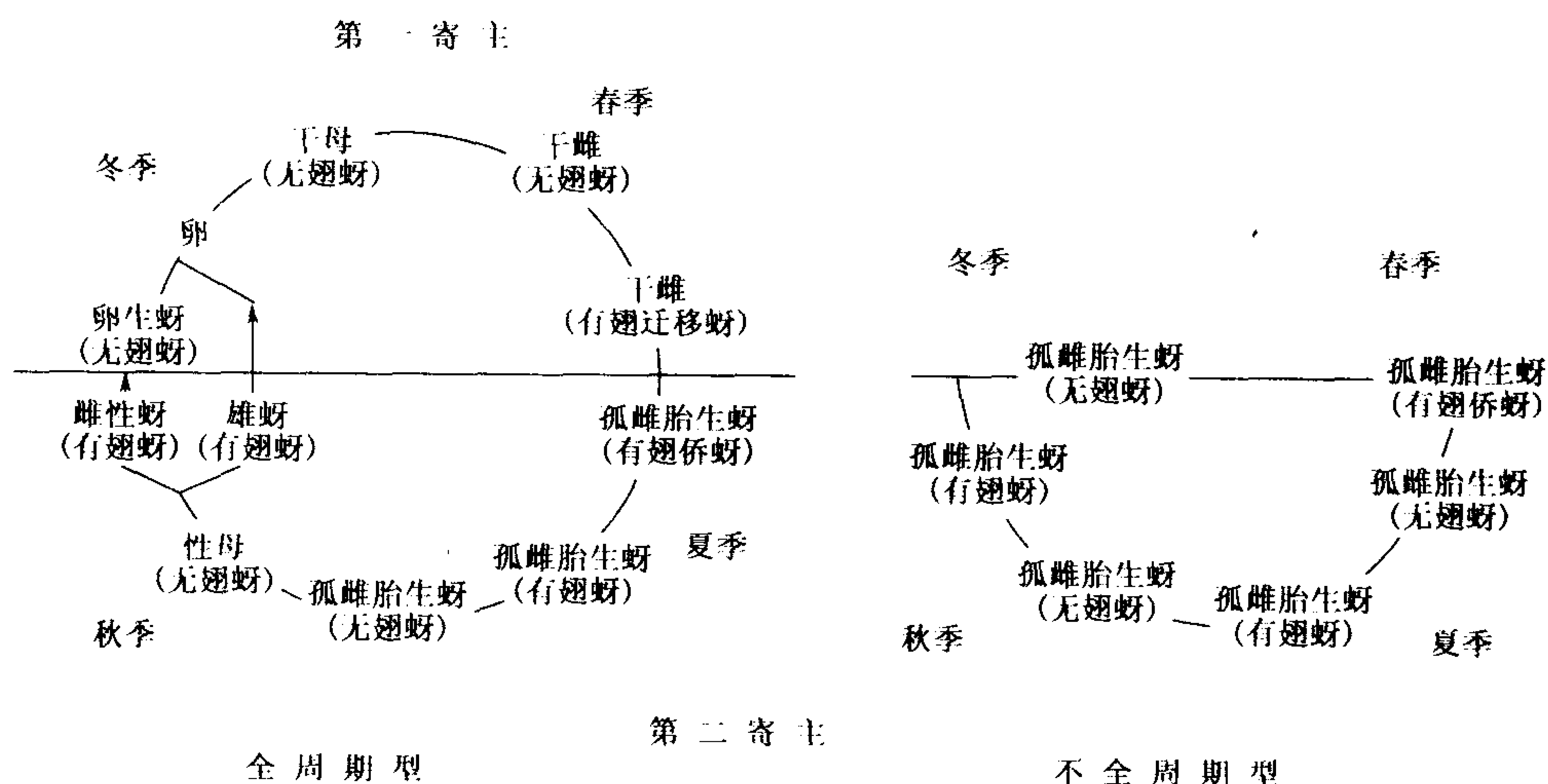


图 11.1　蚜虫的两种不同类型的生命周期。就全周期（holocycle）型而言，蚜虫在两个寄主间（转主）活动，在第一寄主上以虫卵越冬。就不全周期（anholocycle）型而言，蚜虫以无翅蚜（apterae）形式隐蔽越冬，没有第一寄主。承蒙惠允，引自 Robert 和 Lemaire（1999b）。

生命周期因蚜虫种类和气候的不同而异。例如，有些蚜虫可能以孤雌生殖胎生的形式（parthenogenetic viviparous forms）越冬。有些可能在一个属的一种或几种寄主上完成生活史。桃蚜（*Myzus persicae*）是一种重要的介体蚜虫，它以李属（*Prunus* spp.）植物为第一寄主，以 50 余科的其他植物为第二寄主转主活动。

可能有 3 种变化因素会影响蚜虫的传毒能力：

• 一种蚜虫可能包含不同的无性繁殖系（clone）或宗（race），它们存在着或没有形态学上的明显差异。

• 如上所述，蚜虫可以不同的形式存在。

• 昆虫发育过程中的连续蜕皮次数决定其龄期（instar）。

2. 口器

蚜虫的口器由下唇（labium）（喙）的凹槽包被的两对柔软的口针（stylet）组成。取食时口针从喙中伸出。在下颚口针（maxillary stylet）的尖端有一些类似牙齿的突出物（图 11.2）。Forbes（1977）、McLean 和 Kinsey（1984）等详细介绍了取食机物，如吸泵（sucking pump）和食道瓣（esophageal valve）（图 11.3）。

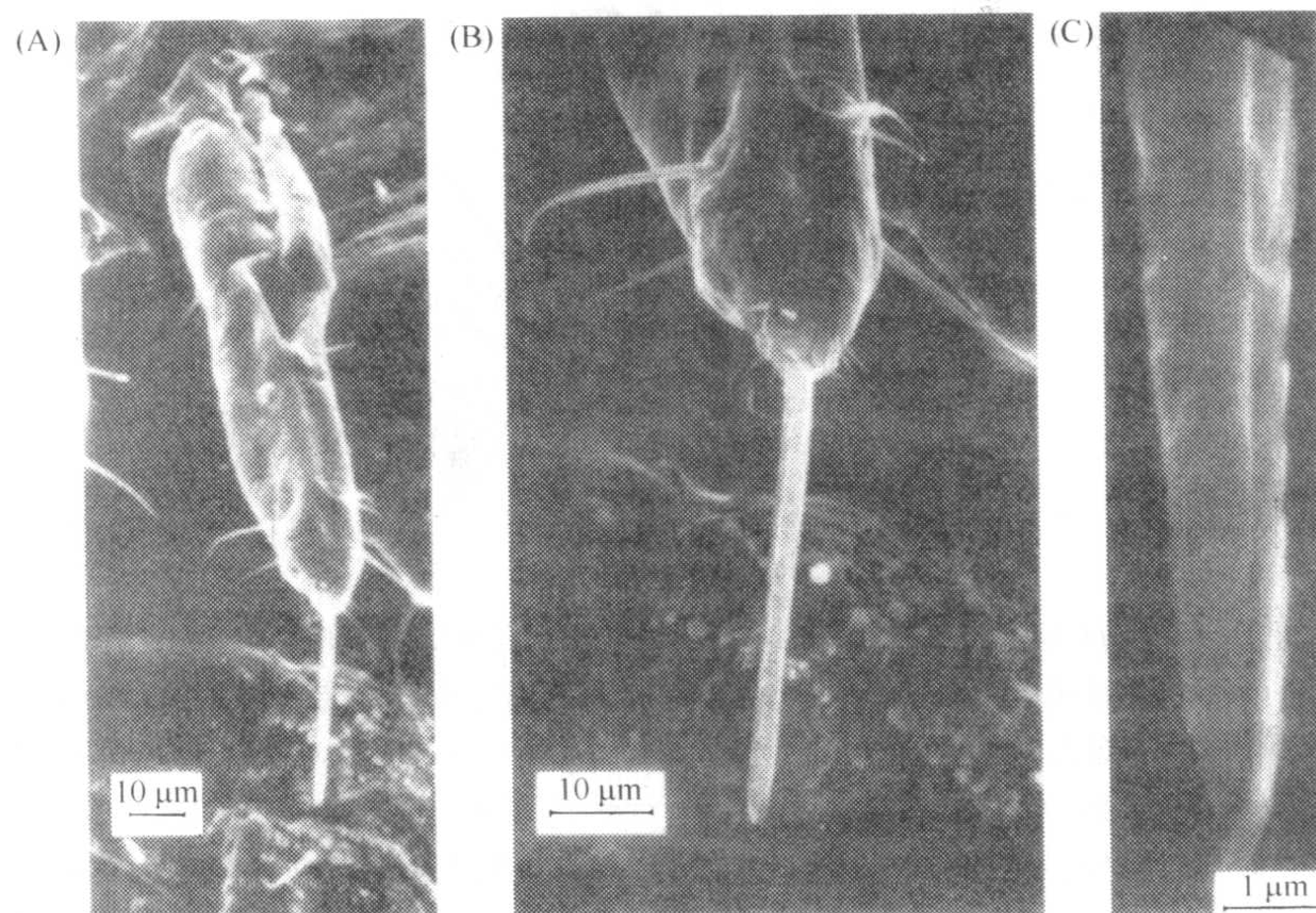


图11.2 桃蚜（*Myzus persicae*）口器的扫描电镜图。(A)具关节区（joint area）和刚毛（bristle）的下唇。上颚口针从下唇突出（在蚜虫从取食叶片中抽回口针后立即将其放在液氮中速冻）。(B)下唇末端和上颚口针的高倍放大图。(C)一对上颚口针末端都有脊纹，其中左右口针的末端紧密嵌合。承蒙惠允，引自 de Zoeten（1968）。

3. 取食习性

取食初期先分泌一些凝胶状唾液，然后口针以试探取食的方式快速穿透表皮，蚜虫可能临时性在此处取食。在穿刺过程中在凝胶状唾液形成的鞘的保护下可以穿刺达到深层组织，口针在细胞间隙移动直至到达韧皮部筛管（sieve tube）（该过程通常需数分钟或数小时）（图 11.4）。

只有下颚口针能够到达筛管。在细胞壁形成的压力作用下下颚口针打开，暴露出食道和唾液道的末端。通过昆虫取食期间的电子监测可以了解昆虫的取食行为和取食位点（详细情况参见 Ellesbury *et al.*，1994）。人们应该了解有两种类型的电子监控系统，即 AC 和 DC，它们显示出不同的波形。此外，欧洲和美国的科学家使用的术语也不同。电子监控蚜虫在韧皮部的取食[图 11.5(A)]的证据表明：它们分泌唾液，而且是含有大量水分和酶类、呈非凝胶状的唾液。事实上，如果蚜虫不在韧皮部分泌唾液，则被局限于韧皮部的循回型和增殖型病毒就不能通过携带病毒的蚜虫进入该组织。在筛管的取食过程中不分泌可形成凝胶状鞘的唾液（gelling sheath saliva），但是在口针拔出的过程中，这种唾液可以将口针形成的通道封住。这种取食过程对筛管和口针经过的通道周

围的细胞破坏作用最小。Pollard（1977）已经对蚜虫的穿刺进行了综述。

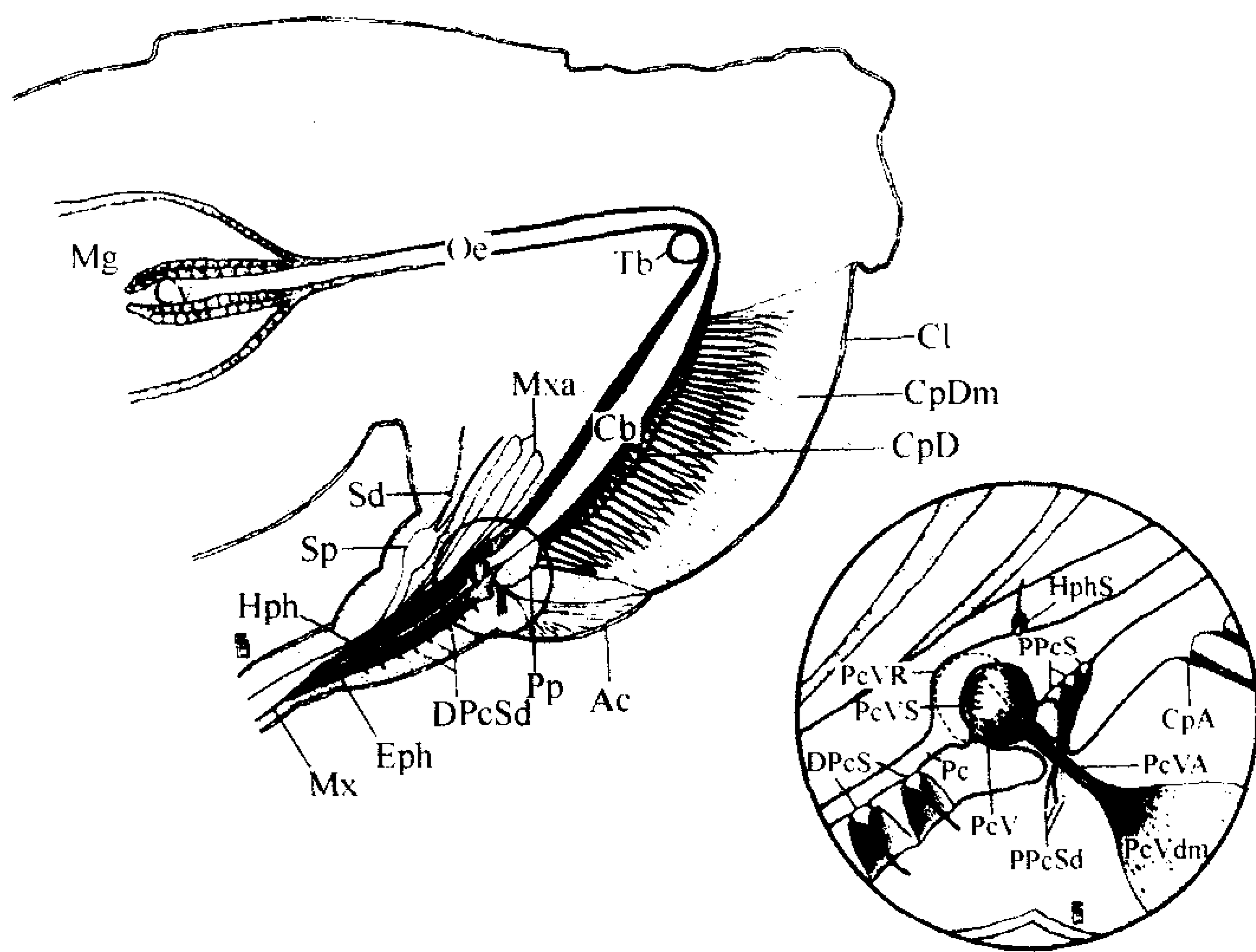


图11.3 豌豆蚜（*Acyrthosiphon pisum*）成虫头部的纵切面图，展现了前消化道的主要结构。本图精确地表现出了内唇的咽突起[epipharyngeal pharynx protuberance (Pp)]（实际偏离中线3 μm）与前食窦瓣（precibarial valve）的相对位置。右下角圆圈内的部分为前食窦道（precibarial canal）与食窦（cibarium，Cb）接汇点的纵切面放大图。在前食窦瓣活塞（precibarial valve piston，PcV）与前食窦瓣囊（precibarial valve receptacle，PcVR）之间的弧形虚线表示一个封闭的瓣。Ac，前唇基（antecylpeus）；Cl，唇基（clypeus）；CpA，食窦唧筒内突（cibarial pump apodemes）；CpD，食窦唧筒膈（cibarial pump diaphragm）；CpDm，食窦瓣扩张肌（cibarial valve dilator muscle）；Cv，贲门瓣（cardiac valve）；DPcS，远端前食窦感器（distal precibarial sensila）；DPcSd，远端前食窦树突（distal precibarial dendrites）；Eph，内唇（epipharynx）；Hph，下咽（舌）（hypopharynx）；HphS，下咽感器（hypopharyngeal sensilum）；Mg，中肠（midgut）；Mx，下颚口针（maxillary stylets）；Mxa，下颚口针内突（maxillary stylets apodemes）；Oe，食管（oesophagus）；Pc，前食窦（precibarium）；PcVA，前食窦瓣内突（precibarial valve apodemes）；PcVdm，前食窦瓣扩张肌（precibarial valve dilator muscle）；PcVS，前食窦瓣缝（precibarial valve suture）；PPcS，近基前食窦感器（proximal precibarial sensilla）；PPcSd，近基前食窦树突（proximal precibarial dendrites）；Sd，唾液道（salivary duct）；SP，唾唧筒（salivary pump）；Tb，幕骨臂（tentorial bar）。承蒙惠允，引自 McLean 和 Kinsey（1984）。

4. 寄主植物的作用

寄主植物的物理和化学特性对蚜虫的取食行为有很大影响。例如，某些甘蓝对甘蓝蚜［*Brevicoryne brassicae*（L.）］（而不是桃蚜 *M. persicae*）的抗性取决于其叶片表面的蜡质层的物理状态（Jadot and Roland，1971）。大豆叶片表面毛状体（trichome）的密度影响几种蚜虫的穿刺行为。SMV 在田间的传播与大豆短柔毛（pubescence）的密度呈负相关（Gunasinghe *et al.*，1988）。化学特性可能也吸引或抑制某些特定种的蚜虫的取食。例如，黑芥子苷（sinigrin）是在十字花科（Brassicaceae）植物上发现的一种芥子油糖苷（mustard oil glucoside），它可以刺激通常在十字花科上取食的蚜虫，但是会抑制一般不在该科植物上取食的其他种类蚜虫的取食（Nault and Styer，1972）。

已有几个例子表明，被病毒侵染的植物更适合昆虫介体的生长和繁殖。豆卫矛蚜（*Aphis fabae*）在被 BtMV 侵染的植物上产生的幼蚜和成年蚜比在健康植物上的多

(Kennedy, 1951)。在病毒侵染的植物上蚜虫拥挤出现得越早，则蚜虫开始迁移的时间就越早。蚜虫在一组植株上的累积增加量是固定的。在其他单叶试验中，植物不同龄期的叶片之间蚜虫数量存在差异。Baker (1960) 发现4种蚜虫在甜菜上的影响很相似。桃蚜 (*Myzus persicae*) 优先选择被BYV侵染的植物为食，并且比在正常绿色植物上的繁殖更快，寿命更长。

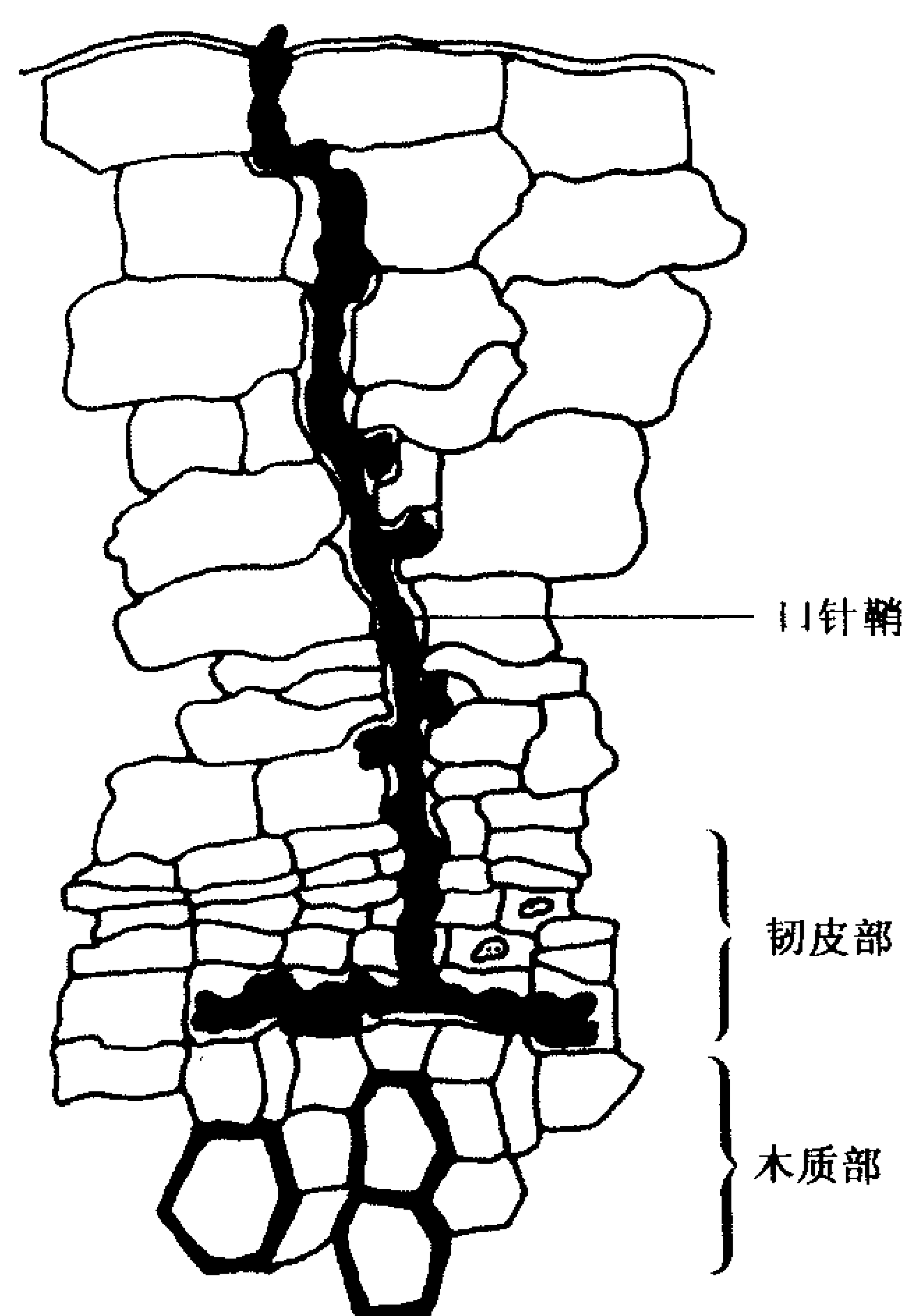


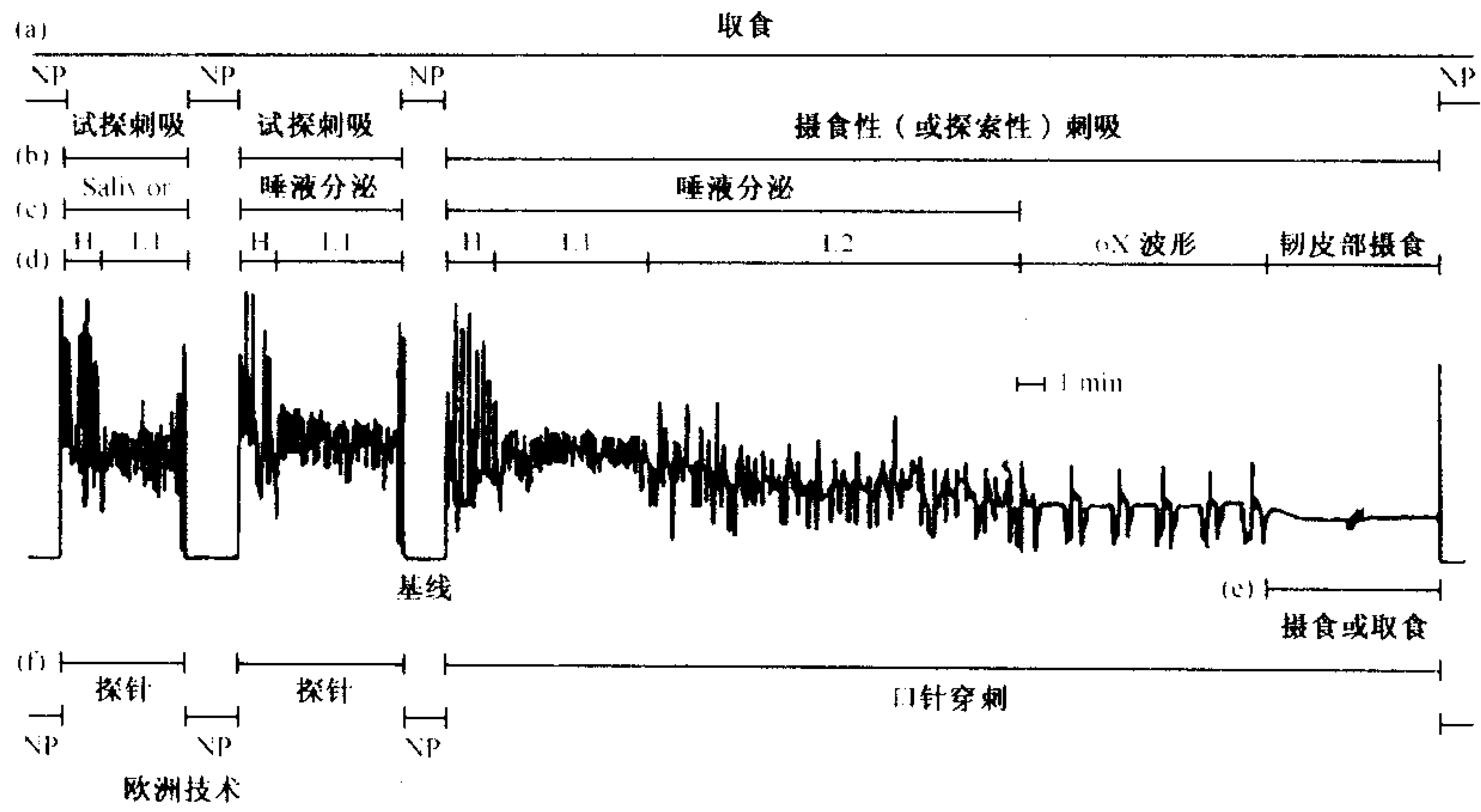
图11.4　曾在韧皮部筛管中取食的一头蚜虫在植物组织中留下的口针鞘(或唾液鞘)(stylet sheath)。承蒙惠允，引自Dixon (1973)。

两种以BYDV侵染的植物为食的蚜虫分泌的蜜露比以健康植物为食的蚜虫分泌的少 (Ajayi and Dewar, 1982)。蚜虫形成成熟的有翅蚜 (alatae) 的比例在被BYDV侵染的燕麦上为85%，而在健康植物上为35% (Gildow, 1983)。另一方面，在BYDV侵染的植物上饲养的蚜虫生活周期变短 (Araya and Foster, 1987)。

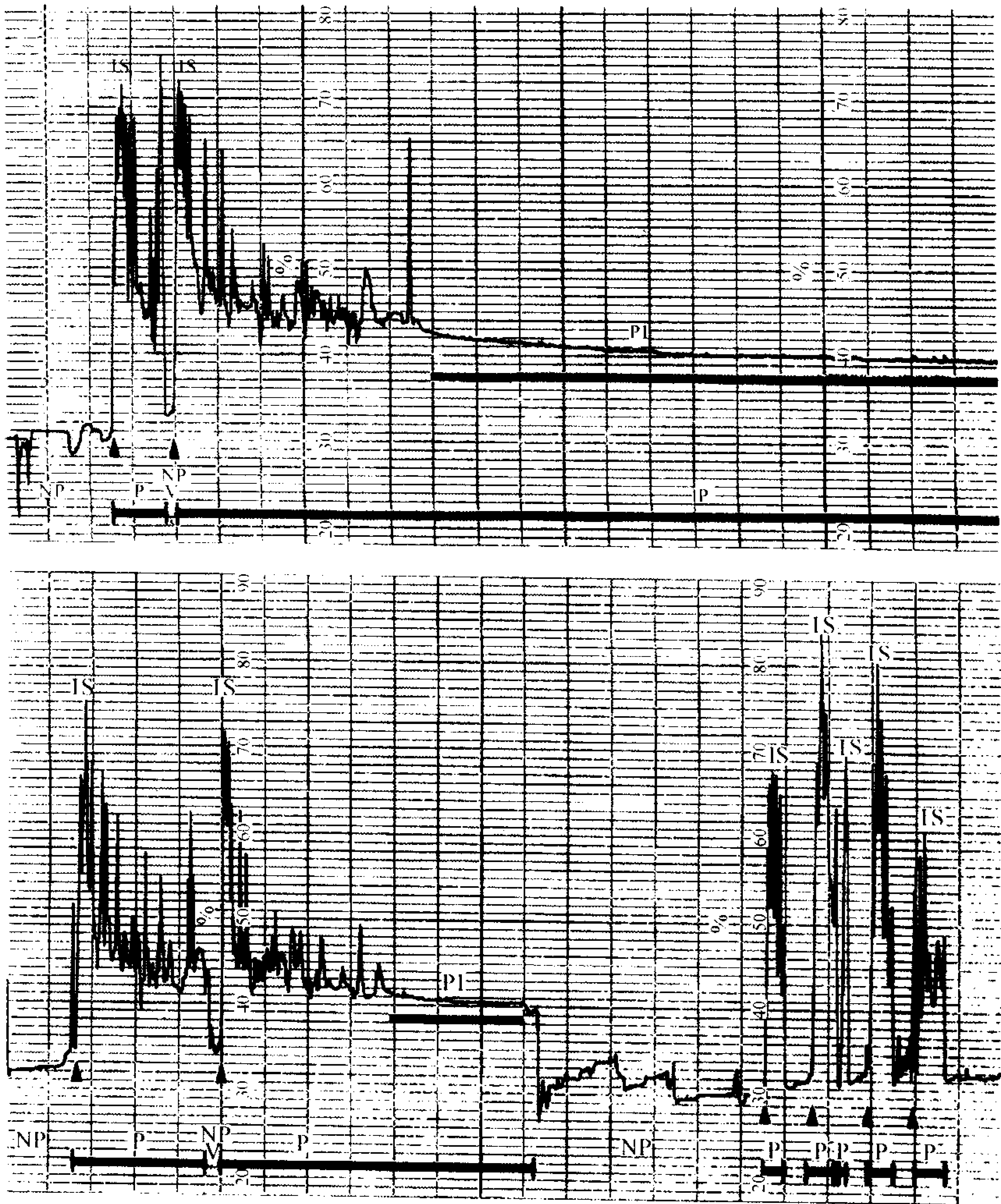
在传播试验中，植物以3种方式参与：①饲喂蚜虫；②作为病毒侵染的材料；③作为健康植物来检验蚜虫的传播能力。通常将不带病毒的蚜虫放在对所研究病毒"免疫"的植物上饲养。然而，当把蚜虫放在病毒侵染的植物上时，这种植物种类的变化可能影响它们的取食行为。被用作毒源或供试植物的种甚至品种的改变都可能会影响传播效率。

接种后如果病毒浓度改变，毒源植物的效率可能会随着时间而改变。如第9章(第Ⅱ节J部分) 所述，病毒在系统侵染的植物中，即使位于组织中的邻近区域，浓度也可能差异很大。这会影响蚜虫的获毒效率。对于特定的病毒而言，当用一种蚜虫作为介体时，植物的种或品种在其感病性方面的差异可能比用另一种蚜虫作为介体时的差异大。

(A) 北美技术


(a)
取食
NP
NP
NP
NP
试探刺吸
试探刺吸
摄食性（或探索性）刺吸
(b)
Saliv or
唾液分泌
唾液分泌
(c)
(d)
H
L1
H
L1
H
L1
L2
oX 波形
韧皮部摄食
1 min
基线
(e)
摄食或取食
(f)
探针
探针
口针穿刺
NP
NP
NP
欧洲技术

(B)


IS
IS
NP
P
NP
P
Pl
IS
IS
P
NP
P
Pl
NP
IS
IS
IS
IS
IS
P
P
P
P
P

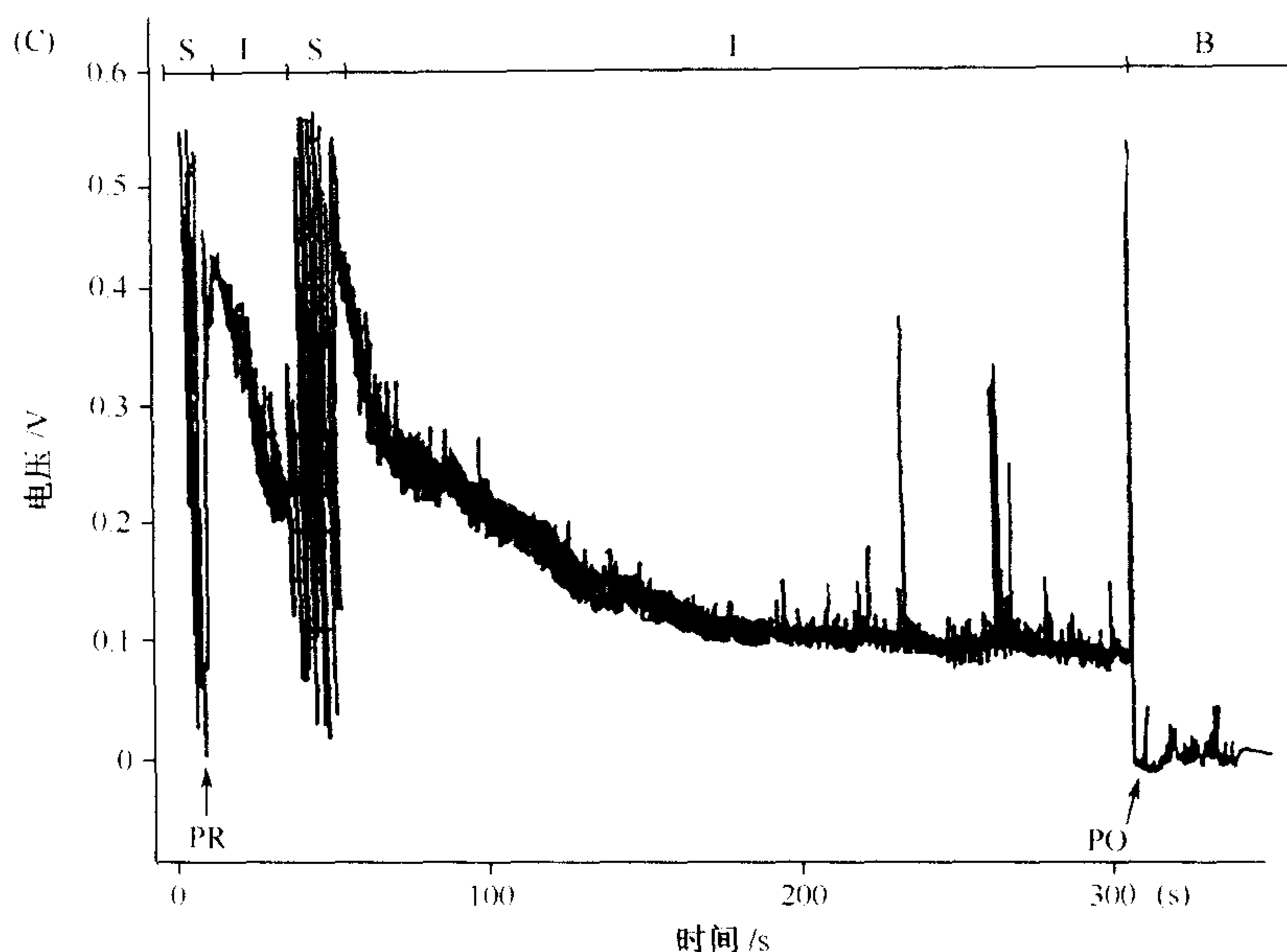


图11.5 对昆虫取食的电子监视。(A) 豌豆蚜 (*Acyrthosiphon pisum*) 对蚕豆 (*Vicia faba*) 叶的3种复合刺吸方式。波形 (waveform) 图上方的线条是对北美洲研究者所使用术语的分级解释 (从波形图顶端开始)。(a) 行, 将取食 (feeding) 界定为包括所有阶段的全过程; (b) 行, 将取食界定为口针全部刺入植物的整个过程, 不论是短暂的试探性刺吸 (testprobe), 还是长时间摄食性 (或探索性) 刺吸 [ingestion (or exploratory) probe]; (c) 行, 根据对蚜虫使用AC (交流电) 监测器得到的经典的诠释 [唾液分泌 (salivation) 或简称S, X波形和摄食 (ingestion) 或简称I], 界定了试探取食的范畴或波形; 在 (d) 行, 唾液分泌阶段也可分为高电压唾液分泌阶段 (H) 和两种类型的低电压唾液分泌阶段 (L1和L2), 然而这些方式的生物学意义还不清楚。波形下方的线条则是对欧洲研究者所使用术语的诠释。(e) 行将摄食与取食看作同义词; (f) 行界定了刺探与口针穿刺的差异。欧洲研究者对波形的诠释未列出, 因为当使用AC监测器时, 3种波形是一致的; DC (直流电) 监测器可形成波形, 但是还未转化为AC监测器所形成的那种波形模式。NP, 非试探取食或非穿刺性的。引自Backus (1994); (B) 叶蝉 (*Cicadulina mbila*) 取食其寄主马唐 (*Digitaria sanguinalis*) (上图) 及非寄主水稻 (下图) 的典型波形。IS, 初始唾液分泌; PI, 吸食韧皮部筛分子; P, 试探取食 (从开始取食至结束); NP, 非试探取食性活动; ▲, 试探取食的开始。带状图 (strip chart) 应由左向右读。每两个竖线间的时间间隔为20 s。引自Mesfin等 (1995)。(C) 蓟马 (*Frankliniella occidentalis*) 取食蚕豆过程的带状图。PR, 试探取食起始; S, 唾液分泌及口针的移动; I, 摄食; PO, 试探取食结束以及口针的抽回; B, 基线 (baseline)。承蒙惠允, 引自Hunter等 (1994)。

5. 环境条件

环境条件, 尤其是温度、湿度和风力可能对蚜虫的运动和取食具有很大的影响。例如, 20～22℃时蚜虫传播和获得SDV的效率均比10～11℃或29℃时的要高 (Damsteegt and Hewings, 1987)。高湿度更利于PVY和PLRV的传播 (Singh *et al.*, 1988a)。光质会影响两种黄症病毒 (luteoviruses) 在番茄属 (*Lycopersicon*) 植物上的迁移和植物对桃蚜所传播病毒的防御 (Thomas *et al.*, 1988)。这些不同的影响将在病毒生态学 (第12章) 和病毒病控制 (第16章) 相关的章节中讨论。环境因素可能也通过影响植

物的感病性和毒源植物内的病毒浓度来影响病毒的传播。

B. 蚜虫介体种群

根据不同的分类方式，已经记述的蚜虫大约有3700种。Eastop（1977）将蚜总科（Aphidoidea）分为3个科。球蚜科（Adelgidae）包含大约45种，仅生活于松柏门（Coniferae）植物上。它们对病毒而言是不重要的。根瘤蚜科（Phyloxeridae）大约含有60种，除葡萄上的根瘤蚜属（*Phyloxera*）外，其他很少有研究。蚜科（Aphididae）包含10个亚科，其中蚜亚科（Aphidinae）含有超过一半的蚜虫种，并且是最重要的病毒介体。在大约600种有无脊椎介体的病毒中，50%是由蚜虫传播的。

关于介体类群的资料只能作为参考，因为所得到的数字有各种方式的偏差。例如，在关于病毒-介体的研究中存在明显的偏好，通常选用分布广泛、在很多种植物上容易饲养的桃蚜和棉蚜作为对象。传播试验的负结果常常不被报道出来。仅有一小部分病毒-介体组合得到实际验证。侵染茄科（Solanaceae）植物的病毒中有22种是蚜虫传播的，其中多数直到大约400年前才遇到马铃薯（Eastop，1977）。因此，肯定还存在很多更重要的、潜在的介体。例如，在荷兰进行的3年研究项目中发现了PVY-N的8种新介体（Piron，1986）。

C. 蚜虫通过损伤细胞传播病毒

低浓度发生的、不稳定的病毒或许可以经过蚜虫饲喂稳定传播，但一些稳定的病毒，如TMV、TYMV和SBMV等却不可以。这种奇怪的情况还不能完全得到解释。许多关于这个问题的实验已经在TMV上进行，得出了如下结果：①蚜虫不能经过其口针传播TMV（Harris and Bradley，1973）；②在实验室条件下，蚜虫可以通过抓叶片表面造成的微伤传播（Harris and Bradley，1973）；③它们可以从受侵染植物上或穿过膜摄入病毒，并以一种可侵染的状态再次释放病毒；④蚜虫唾液不能抑制TMV的侵染；⑤当提纯的TMV与聚（L）-鸟氨酸［poly（L）-ornithine］和KCl混合后，蚜虫能够通过膜获得TMV并通过其口针传播TMV（Pirone，1977）。也许聚（L）-鸟氨酸以某种方式使被口针穿透的细胞更易于侵染，或者促进了病毒在口针里的保持。

D. 蚜虫-病毒关系的类型

Watson和Roberts（1939）首次根据蚜虫获毒后保持传毒能力时间的长短将病毒-介体之间的相互作用定义为持久性（persistent）和非持久性（non-persistent）。从此以后，这些术语随着新的发现不断得到多次修改和重新定义，但是经常引起争议（Hull，1994；Nault，1997；Gray and Banerjee，1999；Blanc *et al.*，2000）。表11.2列出的是目前广泛接受的术语，它们可区分外传型（externally-borne）和内传型（internally-borne）之间以及两种传播类型各自内部的相互作用。这些区别是基于与介体发生相互作用的部位，同时还考虑到了参与相互作用的病毒基因产物。

表 11.2　植物病毒与其传播介体的关系

病毒传播类型			传播特征						
病毒在介体内位点	传播类型	与介体互作的病毒产物	获毒时间（最大剂量）	释毒时间	是否跨龄期（态）传播	是否存在于介体血淋巴	潜育期	是否在介体内增殖	是否跨代传播
外传	非持久性口针传播	外壳	数秒钟至几分钟	数分钟	否	否	无	否	否
	非持久性前肠传播（半持久性）	辅助因子	几分钟至数小时	数小时	否	否	无	否	否
内传	持久循环型	外壳	几小时至数天	几天至数周	是	是	几小时至数天	否	否
	持久增殖型	辅助因子	几小时至数天	几周至数月	是	是	数周	是	通常

表 11.2 总结了不同关系的主要特点。本质上，传播循环可分为 3 个阶段：①获毒期（acquisition phase），即介体在被侵染植物上取食并获得足够量的病毒使其可以传毒的时期；②潜伏期（latent period），在该时期内介体获得足够量的病毒后不能立即进行传播，对外传型的病毒而言没有潜伏期或潜伏期很短；③持毒期（retention period），即介体能够将病毒传播到健康寄主上的时间长度。

还需要进一步定义：①接种能力（inoculativity）是蚜虫或其他昆虫将侵染性病毒传播到健康植物上的能力。②获毒饲喂（acquisition feed）是昆虫从受侵染植物上获得病毒的饲喂过程。③接毒饲喂（inoculative feed）是将病毒传播到健康植物上的饲喂过程。

这些在蚜虫上已经被详细研究过的关系也适用于大多数其他具有刺吸式口器的节肢动物传播的病毒。图 11.6 显示了病毒与其节肢动物介体之间相互作用的基本特点。

E. 非持久性传播

由于许多经济上重要的病毒在田间传播的重要性，在过去的 70 多年中，许多实验室已经对蚜虫非持久传播进行了详细研究，对蚜虫与病毒之间相互作用的分子机制的理解更加清楚。

1. 非持久性病毒

已知的大约 209 种蚜传病毒中大部分是非持久性的（见附录 2）。以下病毒属有确定的成员是以非持久性方式传播的：苜蓿花叶病毒属（*Alfamovirus*）、花椰菜花叶病毒属（*Caulimovirus*）（由桃蚜传播）、黄瓜花叶病毒属（*Cucumovirus*）、蚕豆病毒属（*Fabavirus*）、柘橙病毒属（*Macluravirus*）和马铃薯 Y 病毒属（*Potyvirus*）。这些属包含的病毒有螺旋状的和等轴（球状）的粒体，其基因组有单分体、二分体和多分体的 DNA 和 RNA。

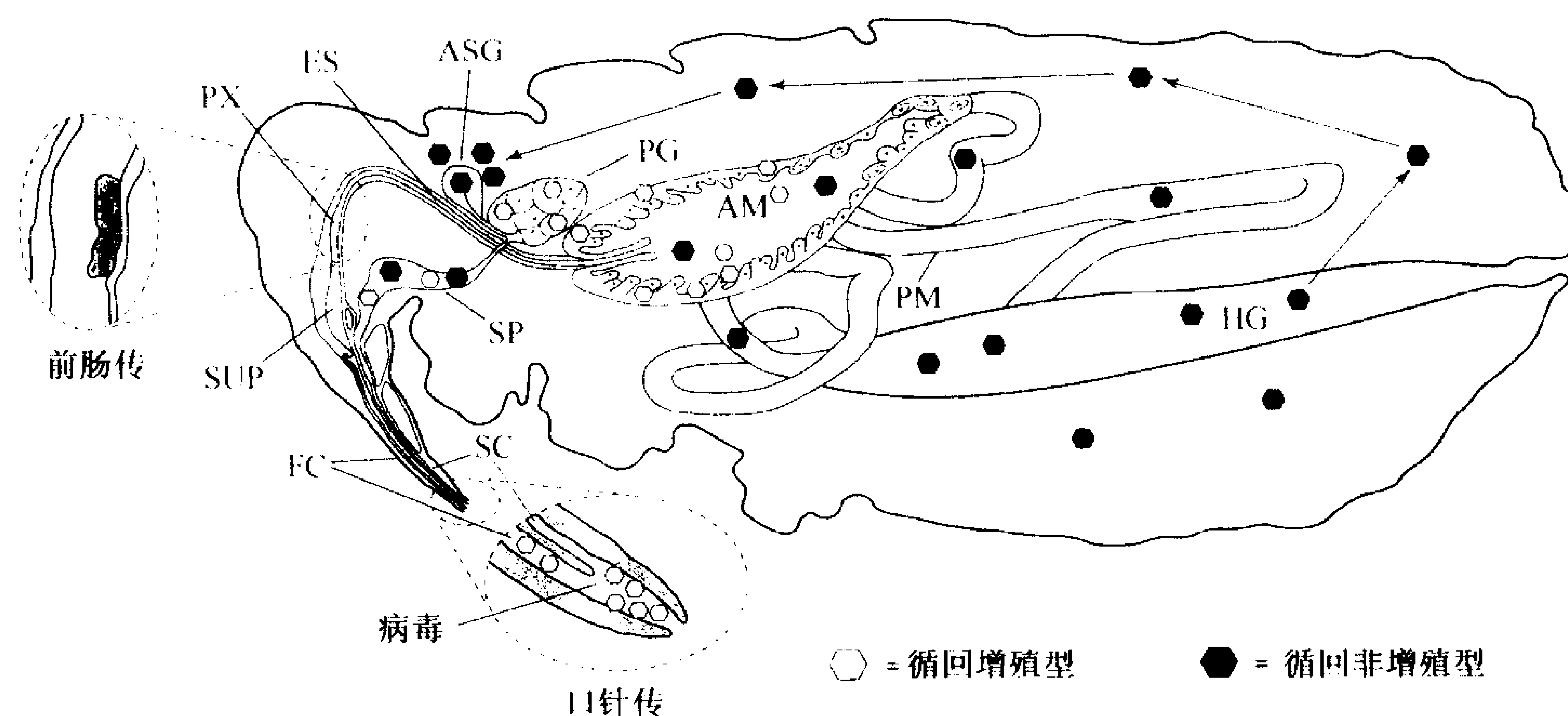


图 11.6 以刺吸式口器的节肢动物为介体的植物病毒的传播机制。图中显示了介体的消化系统及唾液分泌系统的普通解剖学，并且标出了与病毒传播有关的部位。其中一插图表现了口器末端的细部特征图，在口器末端、食道和唾液道正常状况下无病毒。现在公认的由口针传播的一种病毒（非永久性的，非循环的）传播模式中，具传播性的病毒存在于口针端部，在昆虫取食过程中随唾液的释放而传播。另一个插图详细描述了由前肠传播的病毒的传播过程。该种病毒存在于前肠的内表皮层，这部分包括吸泵（SUP）、咽（PX）及食道（ES）。注意该病毒被埋于与表皮相连的一种介质材料中，该介质材料的起源及组成尚不清楚。循环型非增殖性病毒可以从前肠进入中肠前部（AM）、中肠后部（PM），然后进入后肠（HG）。它们不侵染肠细胞，但可以穿过中肠后部和后肠细胞然后释放到血腔（体腔）中。最近的资料表明这些病毒与唾附腺（ASG）密切相连，可运输通过 ASG 细胞然后释放到唾液道（SC）中去。循环型增殖性的病毒可侵染中肠细胞并且随后侵染其他组织，这些病毒最终与主唾腺（PG）相联系，并可能在释放到 SC 中之前，先释放到 ASG 中。SP，唾唧筒。承蒙惠允，引自 Gray 和 Rochon（1999）。

2. 获毒时间

蚜虫对非持久性传播的病毒获毒时间很短，通常只需几秒钟。在这个过程中，蚜虫口针通常不穿透表皮细胞，若穿透表皮进入叶肉和维管组织时，则传播效率迅速降低（Nault，1997）。蚜虫最初发现寄主的行为是靠短暂的刺探，尝试表皮细胞的汁液，这种情况非常适于获毒。因为在非寄主上的试探取食时间非常短暂，因此非持久性病毒的介体通常不在这种植物上定殖。经过饥饿的蚜虫获毒能力提高，这会影响其最初的取食行为。

3. 持毒时间

对非持久性病毒而言，蚜虫在获毒饲喂后很快就失去传染力，侵染性丧失率取决于很多因素，包括温度，以及它们是在植物上还是在人为环境下。对许多非持久性病毒而言，蚜虫在供试植物上饲喂后很快就失去传染性，通常只有几分钟。无论这种植物是否易感染这种病毒，失去传染性的速率是相同的（Bradley，1959）。

决定蚜虫持毒能力长短的主要因素与病毒在田间的传播相关。在许多试验中，试验条件和田间实际情形相差很大。然而 Cockbain 等（1963）模拟田间的条件，允许栓

着的蚜虫在气流中飞行若干不同的时间。无论桃蚜和豆卫矛蚜（*A. fabae*）的有翅蚜是飞行的还是在玻璃皿中禁食的，它们对PMV和BtMV传染性的下降速率几乎相同。图11.7说明了桃蚜在健康的植物上或在玻璃皿中时其失去传播PVY能力的速率。

4. 病毒及病毒株系的专化性

TAV的V株系可以由桃蚜传播，但是CMV的M株系不能由桃蚜传播。这两种病毒以及TMV的RNA可在体外被V株系和M株系的外壳蛋白重新装配，这3种病毒的RNA被V株系的CP包裹后可以被桃蚜并加以通过膜获得传播，但被M株系的CP重新装配后不能被蚜虫传播（Chen and Francki，1990）。这些结果表明蚜虫对黄瓜花叶病毒属病毒的传播依赖于外壳蛋白（参见第Ⅲ节E.7.a）。

同一病毒的不同株系由某一种蚜虫传播时效率可能不同。有些株系可能根本不能被蚜虫传播。一些例子表明，某一特定病毒株系可能获得或失去被某特定蚜虫传播的能力。此外，病毒外壳蛋白的组分在决定传播专化性方面也有很重要的作用（Gera *et al.*，1979）。

与一些增殖型病毒相同，同一非持久性病毒的不同株系之间通常不能相互干扰其传播。因而，Castillo和Orlob（1966）在研究了CMV的两个株系和AMV的两个株系后发现：每个株系都是独立于另一个株系而被蚜虫获得的。传播一种或两种株系的蚜虫的比例与预期的独立传播的概率一致。与此形成对照的是，据报道PVY株系之间可发生这种干扰作用（Katis *et al.*，1986）。

5. 蚜虫特异性

a. 蚜虫种类

蚜虫培养条件可能也影响其传毒效率，因而蚜虫的饲养条件可能影响单个个体的传播效率，进而影响蚜虫介体传毒专化性实验的结果。这个因素可以清楚地说明文献中存在差异的原因。幼虫群体中多数为活跃的个体，而老的群体传播效率较低并且传播能力差异较大。

不同种的蚜虫在能够传播的不同病毒的数目方面各不相同。其中一个极端的例子是桃蚜，它能够传播很多种非持久性病毒。其他蚜虫通常只传播一种病毒。这些差异部分地反映了不同蚜虫被测验的程度，但是毫无疑问存在着传毒多功能性（versatility）的真正差异。

就传播特定病毒的蚜虫种而言，某一种可能比其他的更有效。在关于这个问题的试验中，不能确保某些因素如群体的年龄和活力，并且寄主植物能完全得到控制。然而，在实验设计中即使相当注意这些因素，在介体传播效率方面仍有很大区别。因此，Bradley和Rideout（1953）发现即使在获毒饲喂和饲喂时间相同的情况下，不同种蚜虫传播PVY的效率也存在很明显的差异（图11.8）。这能反映不同种的蚜虫在供试植物上最初的取食行为。

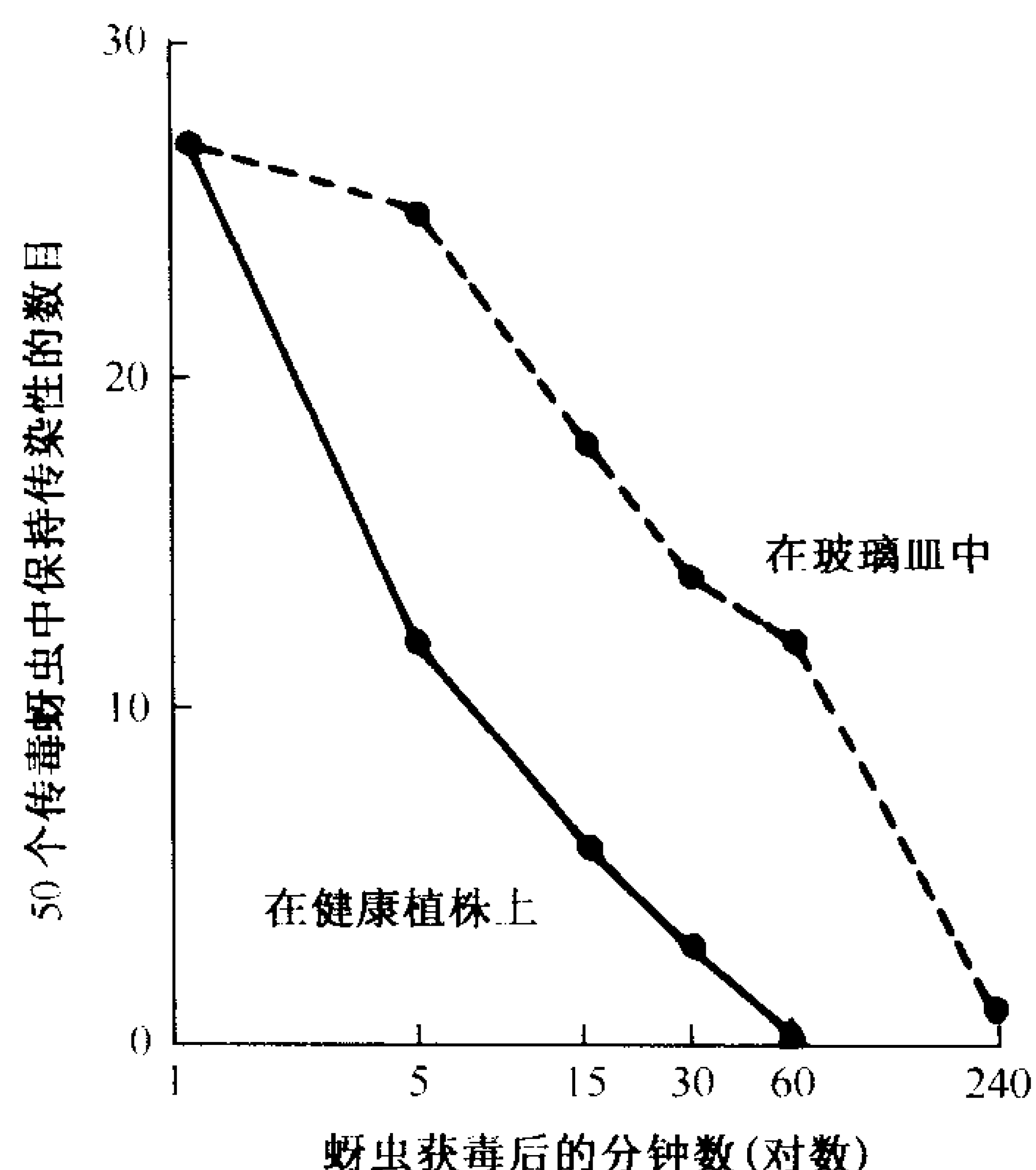


图11.7 经过取食健康烟草叶片或在玻璃皿中禁食一定时间，有传染性的桃蚜将失去传播PVY的能力。承蒙惠允，引自Bradley（1959）。

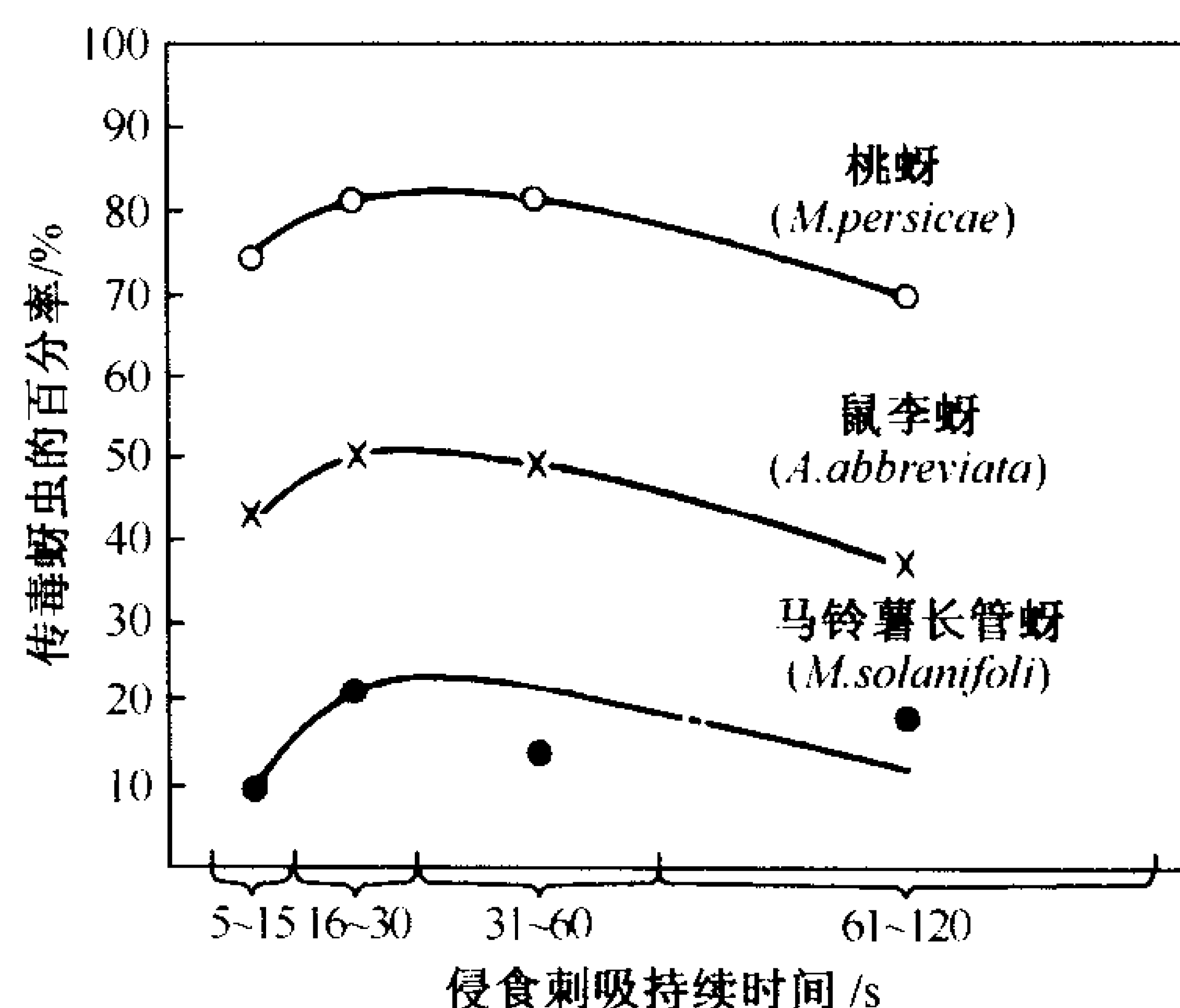


图11.8 3种蚜虫[桃蚜、鼠李蚜(*A. abbreviata*)与马铃薯长管蚜(*M. solanifoli*)]在限定的获毒取食时间后传播PVY的相对效率。承蒙惠允，引自Bradley和Rideout（1953）。

b. 单一种群中的非传毒蚜虫

当检测单头蚜虫对某特定病毒的传毒能力时，并非所有的个体在初次试验时就可传播。然而，用两种PVY的介体进行试验，Gibson等（1988）发现在第一次试验中不能传毒的蚜虫个体可能在第二次试验时可以传毒。因此，还没有证据表明特定的介体种群存在不一致性。对任何特定病毒、蚜虫介体和寄主植物的组合而言，看来存在着获毒饲喂与侵染饲喂成功的统计概率。

通过饲喂蚜虫放射性标记的病毒溶液，Pirone和Thornbury（1988）计算出，单头棉蚜饲喂10 min可以获得10～4000个马铃薯Y病毒属病毒粒体。即使这些估计是在人工饲喂试验条件下进行的，这也可以表明在同一群体中的不同个体带毒量有很大变化。

c. 蚜虫形态

在大多数试验中都用有翅（alate）或无翅胎生雌蚜（apterous viviparous female）。一种蚜虫为适应不同季节和不同寄主植物而存在的不同形态可能在传毒效率方面不同，然而在这一点上已进行详细研究的种类还不多（Gill，1970）。

d. 蚜虫无性系

蚜虫可以无性繁殖（clone）系而存在的现象，或许表明解剖学上存在着细微的差别。这些无性系可能在传毒效率上有差别。例如，Jurik等（1980）发现豌豆蚜（*Acyrthosiphon pisum*）的36个无性系在传播BYMV能力方面有很大差异。成功传播率在3%～37%，并且与无性系的颜色或其在捷克共和国内的地理起源无关。

e. 种群地理差异

起源于美国和新西兰的豌豆蚜种群传播SDV株系的效率比日本种群低（Damsteegt and Hewings，1986）。

6. 持毒位点

与上面记述的相同，当蚜虫降落在一片叶上时，它可能短暂地刺入叶片（通常不超过 30 s）[图 11.5(A)]。因而，蚜虫在接触叶上最初的行为对其获得非持久性病毒是非常适合的。

蚜虫在病毒侵染植物上的试探取食会污染口针尖端、食道和前肠。这些位点是很好的病毒保持位点，随后通过再次试探取食将病毒注射到健康植物中。早期的工作集中于研究作为保持位点的口针顶端。然而，通过福尔马林或紫外辐射处理以除去病毒的试验可能会对蚜虫的刺探取食行为有负面影响（Bradley，1966）。电子显微镜观察表明，存在于一种基质中的 TVMV 和 TEV 粒体主要附着于下颚食物道（maxillary food canal）的上表皮（epicuticle）（Ammar *et al.*，1994），而很少有粒体黏附于前肠的前食窦和食窦上。在下颚食道的末梢 1/3 处可以检测到放射性标记的病毒（Wang *et al.*，1996；Wang and Pirone，1996）。这样，在病毒非持久性传播过程中，下颚食道是侵染性病毒的保持位点已经被证实。但是，这些证据只是表明其是积聚点，而不能证明病毒是否被传播。

7. 病毒-介体分子互作

在非持久性病毒传播的过程中相互作用分为两个阶段，即病毒在特异性位点的保持和病毒的释放（Gray and Banerjee，1999）。所有非持久性传播的病毒都有一个结构简单的核酸，被一种或多种外壳蛋白包裹形成二十面体或杆状粒体。因而，外壳蛋白被用于相互作用。已经确定了保持阶段的两种互作方式：一种是病毒的衣壳和蚜虫的持毒位点直接相互作用；另一种涉及病毒编码的非结构蛋白的参与。这种非结构蛋白已经被命名为辅助组分（helper component），是帮助蚜虫传播病毒的辅助因子（Pirone and Blanc，1996）。还有一些病毒的基因产物直接控制病毒的传播，另外一些病毒的基因可能间接影响病毒传播。传播效率可能受病毒浓度的影响，病毒浓度又是由病毒的复制和周转决定的（Atreya *et al.*，1992）。同样地，病毒的获得受到病毒在寄主中的定位以及介体和寄主相互作用位点的影响。病毒基因，如那些参与病毒细胞间移动的基因，可能影响病毒在寄主体内的分布。

a. 外壳与介体的直接互作

AMV 和 CMV 的传播涉及衣壳和蚜虫介体中病毒结合位点的直接连接。最初的证据来自于，在不加其他蛋白质或因子的情况下提纯的病毒可以在人工饲喂系统上传播。大部分详细的证据来自对 CMV 的研究。Gera 等（1979）使蚜传能力强的株系（HAT）和蚜传能力弱的（PAT）株系的基因组和外壳蛋白之间形成了异源装配的粒体，结果表明蚜虫传毒效率与外壳蛋白的来源无关。外壳蛋白的大小没有差别，因而，没有证据表明在可传播的株系中存在着辅助组分蛋白的通读（readthrough）（参见第 6 章第Ⅷ节 A.2）。Chen 和 Francki（1990）基于对黄瓜花叶病毒属的其他病毒的研究得到了相似的结果，表明用 TAV 的外壳蛋白包裹 TMV 的 RNA 可以使该异源包裹的病毒具有蚜传活性。M-CMV（一个蚜传能力弱的株系）外壳蛋白中一个氨基酸的改变对桃蚜传毒的恢复是必需的（Perry *et al.*，1994）。然而，与第 129 位和第 162 位氨基酸对桃蚜传毒

的重要性相比，第25位、168位和214位氨基酸对棉蚜传播PAT株系更重要（Perry *et al.*，1998）。这些氨基酸不一定直接参与与介体的相互作用。除了可能是由于杂食性作用影响介体从寄主中获得病毒外，这些氨基酸可能对外壳蛋的折叠以及（或者）病毒在介体内的物理稳定性是重要的。

有人利用棉蚜和桃蚜对CMV的7种田间分离株经机械传播后的蚜传稳定性进行了研究（Ng and Perry，1999）。经过24轮机械方式转接（mechanical passage）后，其中一个分离株失去了桃蚜传播能力但仍具有棉蚜传播能力，这表明两种蚜虫与病毒之间的互作存在差异。

b. 辅助组分的间接相互作用

很多年前人们就知道，只有在另一种病毒存在时某种病毒才能被蚜虫以非持久方式传播。例如，PAMV的传播需要PVY的存在。Kassanis和Govier（1971）研究表明PAMV不需要与PVY混合就能被蚜虫传播。蚜虫先在PVY侵染的植物上取食后再转移到PAMV侵染的植物上，随后就可以传播这种病毒。这表明辅助组分对蚜虫的传播是必需的。之后的研究发现辅助组分是辅助病毒的特异性基因产物，其对马铃薯Y病毒属病毒的蚜虫传播是必需的。Raccah等（2000）对其特性已经综述过，在此总结如下：

（1）在体外获毒试验系统中，一种马铃薯Y病毒属病毒的辅助组分可能允许或不能使蚜虫传播其他马铃薯Y病毒属病毒。该现象说明存在着专业性（Sako and Ogata，1980；Lecoq and Pitrat，1985）。

（2）辅助组分必须在饲毒过程中或之前被蚜虫获得，如果在饲毒之后提供，则不能传播。

（3）马铃薯Y病毒属病毒的辅助组分的分子质量在53 kDa（TVMV）和58 kDa（PVY）范围内。它们从病毒编码的多聚蛋白上被切割下来（参见第7章第V节B.1）。作为一个产物，除辅助组分（HC）活性外，还具有一些其他的活性，如蛋白酶（protease）活性等，因而被命名为HC-Pro。

（4）一些马铃薯Y病毒属病毒的HC-Pro（如PRSV、WMV2、ZYMV和TuMV）可以在结合镍（Ni）的树脂上提纯，而其他的则不能（如PVY与TVMV）。

（5）提纯的辅助组分可被用于（通过人工膜饲喂方法）传播马铃薯Y病毒属病毒。

（6）辅助组分的生物学活性形式可能是分子质量介于100～160 kDa的二聚体。

（7）马铃薯Y病毒属病毒的HC-Pro非特异性地结合单链核酸，并优先选择性地结合RNA（Urcuqui-Inchima *et al.*，2000）。该蛋白质包含两个核酸结合域。

通过研究外壳蛋白和辅助组分突变体对蚜虫传播各种马铃薯Y病毒属病毒（potyviruses）的影响，建立了一些分子互作的模型。目前认为辅助组分在病毒衣壳和蚜虫口针之间形成一个桥梁（Raccah *et al.*，2000）（图11.9）。外壳蛋白的N端有3个氨基酸　DAG（天冬氨酸-丙氨酸-甘氨酸），它们对病毒的蚜虫传播有重要作用（Lopez-Moya *et al.*，1999）。突（诱）变结果表明，DAG序列模体本身以及其前后的氨基酸序列均可影响病毒受蚜虫传播的能力（Lopez-Moya et al.，1999）。生化和免疫学分析表明，这个N端区域位于病毒粒体的外表面（Allison *et al.*，1985b；Dougherty *et al.*，1985）。HC-Pro的两个重要区域也已被确定：一个是参与外壳蛋白相互作用的以PTK

（脯氨酸-苏氨酸-赖氨酸）为特征的氨基酸序列；另一个是 KITC（赖氨酸-异亮氨酸-苏氨酸-半胱氨酸）区域，它很可能参与病毒 HC-Pro 在蚜虫口针中的保持。

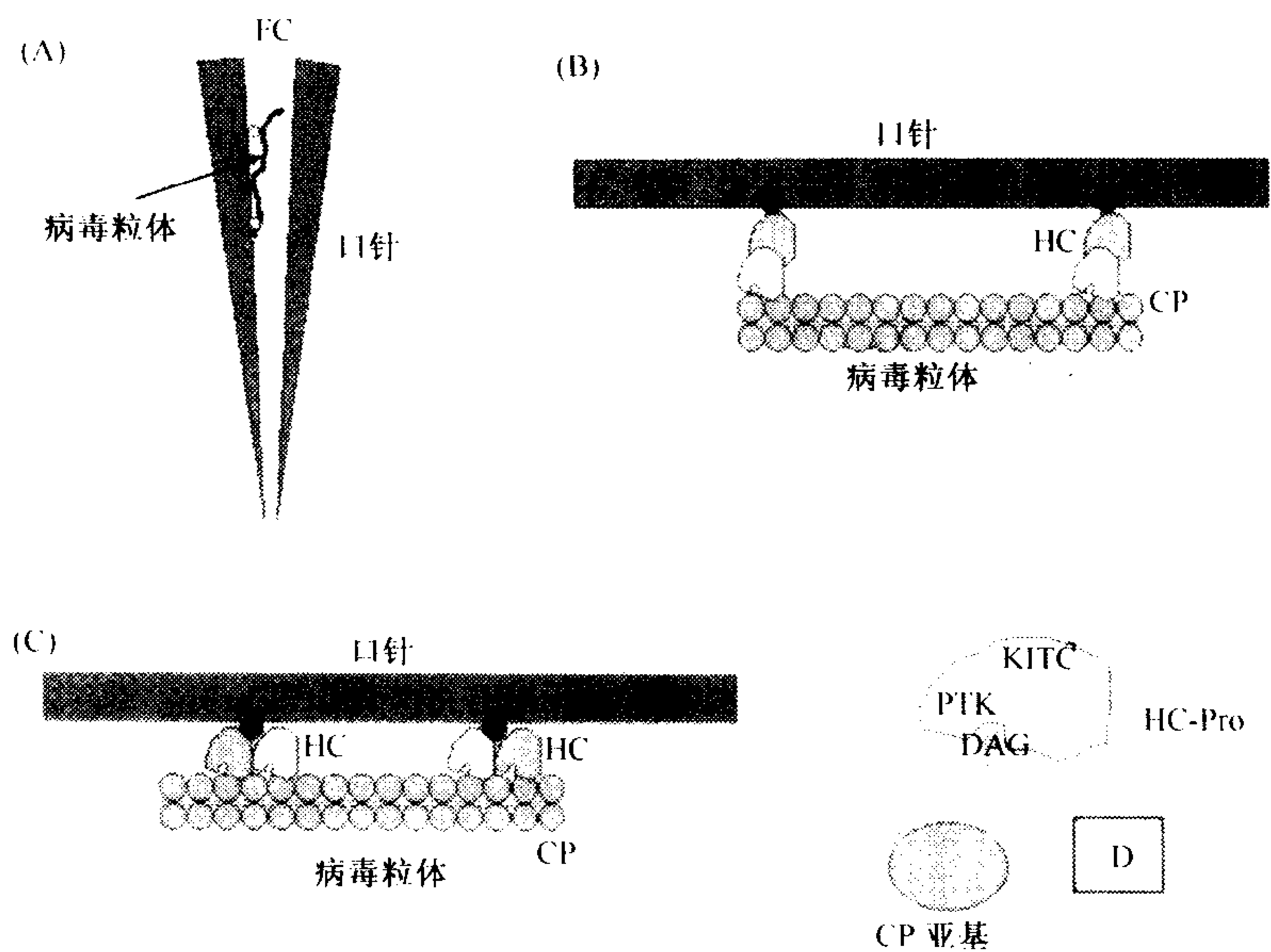


图 11.9 在传毒辅助因子（HC-Pro）、蚜虫口针和马铃薯 Y 病毒属病毒的外壳蛋白之间可能发生的互作的模型。（A）病毒粒体的位置靠近食物道前端。（B）两个 HC-Pro 分子间相关联的模型。注意第一个 HC-Pro 分子与口针上的“受体”相连，而第二个 HC-Pro 分子与外壳蛋白亚基相连。（C）另一个模型：需要一个二聚体与口针上的“受体”结合。两个 HC-Pro 分子均与外壳蛋白亚基相连。（D）HC-Pro 中的 PTK 模体与外壳蛋白亚基 N 端的 DAG 模体间可能发生的结构上的结合。FC，食物道；KITC，赖氨酸-异亮氨酸-苏氨酸-半胱氨酸；PTK，脯氨酸-苏氨酸-赖氨酸；DAG，天冬氨酸-丙氨酸-甘氨酸；HC，传毒辅助组分；CP，外壳蛋白。承蒙惠允，引自 Raccah 等（2001）

c. 释放

关于非持久性病毒虫蚜虫口针结合位点的释放机制了解地还很少，但是已经提出了 3 种假说（Gray and Banerjee，1999）：①机械传播假说认为病毒只是通过口针接种的（Kennedy *et al.*，1962）；②在摄取-排泄假说中，释放受到吐弃（回吐作用，regurgitation）和唾液分泌的影响（Harris，1977）；③由于食道与口针的唾液道在下颚口针的顶端处融合，非持久性口针传病毒也能够被唾液单独释放（Martin *et al.*，1997）。

F. 半持久性传播

1. 半持久性传播的病毒

5 个病毒属成员的蚜传有一些特点介于非持久性和循回型之间，尽管作为一个组群，这些病毒之间的传播特性也各不相同。

半持久性病毒中研究最清楚的是花椰菜花叶病毒属病毒（Pirone and Blanc，1996；Blanc *et al.*，2000）和长线病毒属的 BYV 和 CTV（Raccah *et al.*，2000）。长线病毒属病毒存在于韧皮部，而花椰菜花叶病毒属病毒在许多类型的细胞中均存在。花椰菜花叶

病毒属病毒已经被详细研究过，它们的传播需要辅助组分的参与。

辅助组分已经在伴生病毒属病毒（sequiviruses）（Harrison and Murant，1984）中发现，但是还没有正式确定。伞形花二尾蚜（*Cavariella aegopodii*）以半持久方式传播AYV和PYFV。PYFV与AYV一样，是直径约为30 nm的、小的等轴RNA病毒（Hemida *et al.*，1989），只有当蚜虫携带一种不能经汁液传播的AYV病毒时才可以传播PYFV。与一些非持久性病毒的辅助组分不同，AYV本身就是PYFV的辅助组分（Elnagar and Murant，1976）。然而，如果蚜虫已经携带辅助病毒AYV，则蚜虫可以从单独被PYFV侵染的植物上获得。这表明非持久性病毒可能需要辅助蛋白的参与，而AYV在介体前肠中有一个特定的保持位点（Harrison and Murant，1984）。

研究表明香石竹潜隐病毒属病毒（carlaviruses）和长线病毒科病毒（closteroviruses）的传播可能需要辅助组分的参与（Murant *et al.*，1988b）。在两个半持久性病毒之间存在着另外一种辅助关系：一种葡萄病毒属病毒（独活潜隐病毒，*Heracleum latent virus*，长为730 nm，杆状）依靠一种长线病毒属病毒（独活病毒6号，*Heracleum virus* 6，长为1600 nm，杆状）才可以被蚜虫传播。在这个系统中两种短杆状病毒的一端可能互相黏附（Murant，1984；Murant *et al.*，1988b）。长线病毒属病毒粒体5′端异常的外壳蛋白可能与蚜传相关（Agranovsky *et al.*，1995；Febres *et al.*，1996）。

2. 病毒-介体间的分子互作

CaMV或花椰菜花叶病毒属的其他成员以半持久性方式被桃蚜传播时，需要辅助组分（或蚜传成分）的参与。CaMV的辅助组分具有以下特点：

• 与马铃薯Y病毒属病毒一样，辅助组分必须在获毒过程中或之前被蚜虫获得。

• 其他花椰菜花叶病毒属的辅助组分可以互补CaMV辅助组分的缺失（Markham and Hull，1985）。

• CaMV的辅助组分系统涉及两种非外壳蛋白：ORF（可读框）Ⅱ编码的18 kDa产物（P2或P18）和ORF Ⅲ编码的15 kDa产物（P3）（CaMV的基因图见第6章，第Ⅳ节A.1）。

• 在受侵染细胞中，P2在晶体状内含体中存在（图6.1），而P3与病毒粒体相关联。

• P2与连接两个结合区域的微管发生强烈的相互作用，这两个区域分别位于N端和C端。

因而，CaMV的辅助组分系统比马铃薯Y病毒属成员的更加复杂。用杆状病毒（baculovirus）表达的P2蛋白和不可传播的分离株侵染的植物汁液混合后饲喂蚜虫，病毒可以传播；但是用P2＋提纯的病毒饲喂蚜虫，病毒不能传播（Blanc *et al.*，2000）。然而，当在提纯的病毒中加入P3时，病毒可以传播（Leh *et al.*，1999）。预测P2蛋白的二级结构含有两个区域，N端特点是β折叠（β-sheet）结构，C端特点是α螺旋（α-helix）结构，这两个区域可能被其他不规则结构隔开。C端61个氨基酸与部分提纯的病毒相互作用，并与P3蛋白N端30个氨基酸相互作用（Leh *et al.*，2000）。N端区域缺失突变后失去其辅助传播的能力，但不影响其结合半提纯病毒的能力。这就产生了CaMV辅助系统调控的模型（图11.10）。P3形成一个四聚物（tetramer）（Leclerc *et*

al.,1998)，与病毒 P4 蛋白组成的衣壳结合，P3 与 P2 的 C 端结合。P2 的互作据认为是通过卷曲螺旋结构而发生的，但是这些结构的自身互作可能会干扰与 P3 的互作（Hebrard *et al.*,2001）。P2 蛋白的 N 端与蚜虫前肠位点结合形成桥。P2 蛋白与微管结合活性的作用还不清楚，但是，P3 蛋白的微管结合区与蚜虫结合区重叠。

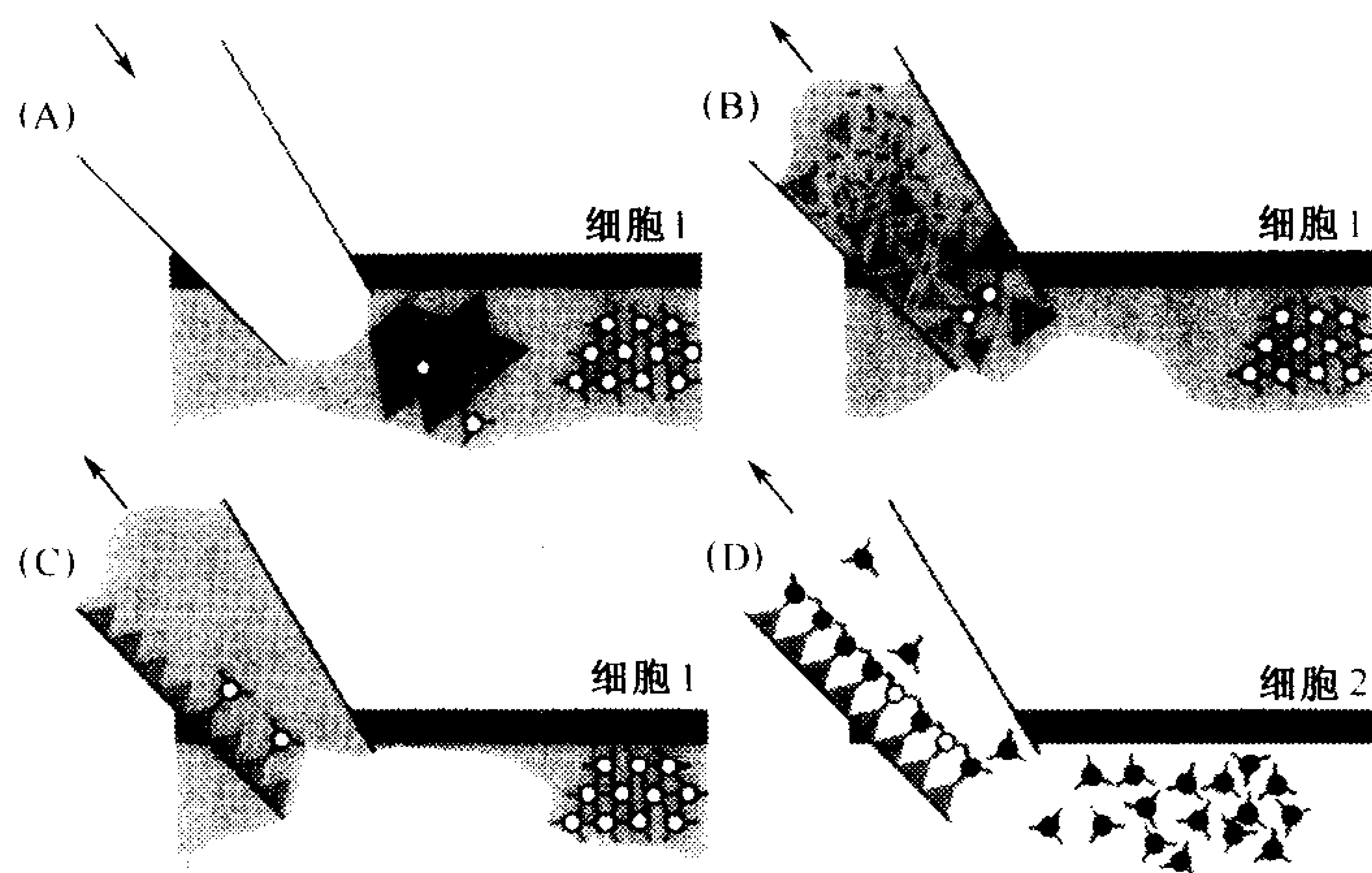


图 11.10 （见彩色图版 11.1）蚜虫从受侵染细胞取食后相继获得 CaMV 的模型。(A) 在受侵染细胞中，病毒粒体中与传播相关的组分在空间上包括电子透明的内含体（eliB）（左边结构）和电子致密的内含体（ediB）（右边结构）。然而大部分病毒粒体（空心圆圈）与 P3（蓝线条）组成复合物并储存于 ediB 中，P2（红三角）与 P3 松散结合并且有零星的病毒位于 eliB 中。当蚜虫口针（左上方）刺破细胞壁时，唾液被注射进植物细胞中。(B) 在分泌唾液后，蚜虫通过口针吸取出一些与病毒的内含体混合的植物细胞内容物。如果一个 eliB 被吸上来，它会立即（通过蚜虫唾液的作用或纯粹的稀释效应）解体并释放出其组分 P2、P3 以及最终一些稀少的 P2：P3 病毒粒体复合物。(C) 当恢复自由的 P3 被摄食时，释放出来的 P2（可能与来自 eliB 的几个病毒：P3 复合物一起）附着于蚜虫口针的角质层（cuticle）上。该蚜虫目前即处于“P2-装载”状态，因此具有传毒能力，并且随时可从同一细胞或（D）在同一或不同寄主植株的细胞中获得更多的 P3：病毒粒体（实心圆圈）。承蒙惠允，引自 Blanc 等（2001）。

和非持久性病毒一样，病毒从介体中释放的分子机制尚不清楚。

G. 双态传播

对一些蚜虫传播的研究（Chalfant and Chapman，1962）发现：一种病毒被同种蚜虫传播时既可以非持久性方式，也可以半持久性方式传播，这称为双态传播（bimodal transmission）。然而，在这个报道中还存在着许多不一致的情况，其中多数可能是由于其他因素（如蚜虫-植物的相互作用）造成的。Blanc 等（2001）认为病毒-介体互作的分类应当基于传播的分子策略，因此双态传播这个术语是不必要的。

H. 持久性传播

表 11.2 中总结的是持久性传播的主要特点。以这种方式传播的病毒通常可由一种或几种蚜虫传播。黄化和卷叶症状通常是由持久性传播的病毒引起的。在蚜虫体内存在

的病毒有些可以增殖（增殖型，propagative），有些不能增殖（循回型，circulative）。对一个作为传播介体的蚜虫而言，无论它与病毒之间属于哪种关系，它都必须从侵染的植物上摄取病毒，病毒经过血淋巴（hemolymph）到达唾腺，随后被释放到健康植物中。因此，它至少要经过两种屏障，即前肠壁和唾腺壁。

1. 循回型病毒

在介体体内的复制尚未得到证实、属于循回型（持久性）的病毒主要有：黄症病毒科病毒（luteoviruses）（其中 BYDV 和 PLRV 已经被详细研究过）、PEMV（为一种黄症病毒和一种幽影病毒的复合体）和矮缩病毒科病毒（nanoviruses）（参见第 2 章第Ⅲ节 P. 3）。其他一些尚未得到完全鉴定的病毒也以这种方式传播。

a. 黄症病毒科病毒

i. 传播的一般特征

最短获毒时间至少要 5 min（对 BYDV 而言；Duffus，1972），通常需要几小时。随后有一个至少 12 h 的潜伏期，之后病毒才可以传播，接毒时间 10～30 min。蚜虫保持传毒能力至少几天。麦二叉蚜（*Schizaphis graminum*）在 5 个阶段传播 BYDV 的能力有很大差别。蚜虫传播的百分比从一龄的 36%下降到成年的 2%（Zhou and Rochow，1984）。

ii. 介体摄取病毒的途径

如上所述，持久性病毒必须至少通过前肠壁和唾腺壁的屏障。关于循回型病毒的详细研究已经在黄症病毒上研究过（Gildow，1987；1999）（图 11.11）。Gildow（1985）的研究表明 CYDV-RPV 的粒体（以前是 BYDV-RPV）仅与介体禾谷缢管蚜（*Rhopalosiphon padi*）的后肠细胞膜相连，他认为粒体通过内吞作用（endocytosis）进入后肠细胞，分布于有被小窝（coated pit）和有被小泡（coated vesicle）上，在管状小泡（tubular vesicle）和溶酶体（lysosome）中积累[图11.11(A)]。与肠膜的互作或穿越肠细胞调控了马铃薯卷叶病毒（PLRV）一个株系的传播效率（Rouzé-Jouan *et al*. 2001）。

然后病毒粒体通过质膜与管状小泡的融合而释放到血腔（hemocoel）中。蚜虫唾腺由两个主腺体和两个附腺组成（Ponsen，1977）。在关于 BWYV、PLRV 及其介体桃蚜的唾腺之间相互作用的研究中（Gildow，1982），发现病毒粒体在基片（basal lamina）和附腺细胞的原生质膜凹陷处[图11.11(B)]。还发现粒体在唾腺附近原生质的管状小泡里出现，并且分布于与导管膜（canal membrane）相连的有被小窝（coated pit）中。基片和基础原生质膜分别可被看作不同黄症病毒属病毒-蚜虫复合体传播的屏障（Gray and Banerjee，1999）。从这些研究可知，黄症病毒属病毒穿过两层屏障进入其蚜虫介体体内的途径看来是通过并入有被小泡并转运穿过细胞。因此，与病毒粒体相互作用的主要位点是肠壁细胞的原生质膜和唾腺附属细胞的血腔壁原生质膜，唾腺附属细胞可能是介导相互作用的受体。

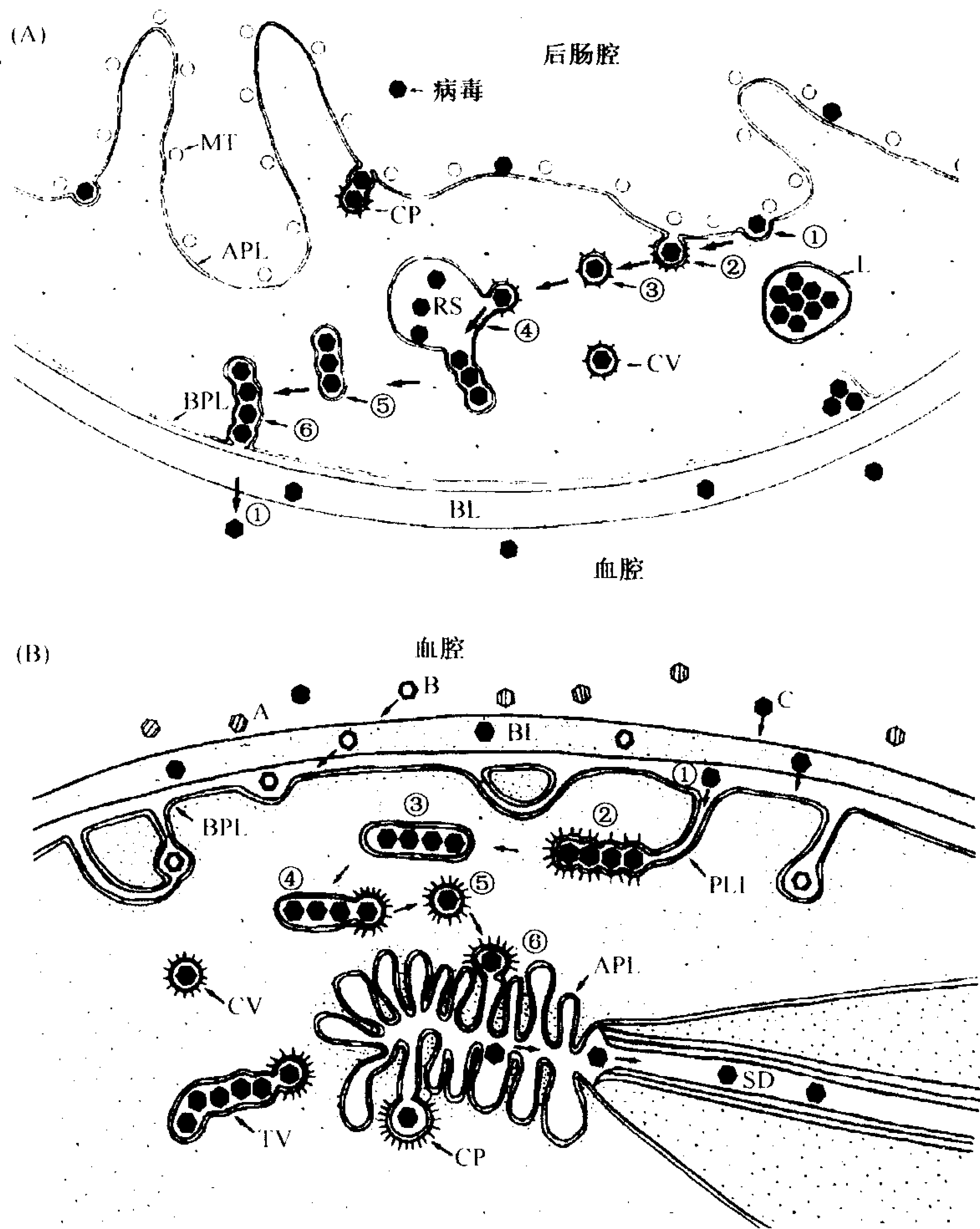


图11.11 黄症病毒（luteoviruses）在蚜虫介体体内的互作和跨细胞运输的模型 （A）通过蚜虫肠壁上皮细胞的跨细胞运输。与内吞和外排相关的超微结构的观察结果支持受体介导的胞吞作用（endocytosis）作为调节介体特异性获得黄症病毒的一种机制。基于该模型，受到肠细胞顶端质膜（apical plasmalemma，APL）识别的黄症病毒结合在膜上①起始病毒凹陷②进入有被小窝（CP）。有被小窝从APL处出芽成为含有病毒的有被小泡（CV），CV将病毒③转运到较大的称为纳（入）体（receptosome，RS）的无被小泡中，RS发挥作用浓缩该病毒④。含有线性病毒聚集物的管状小泡在纳体⑤上形成并将病毒转运到基部质膜（basal plasmalemma，BPL）。可以观察到含有病毒的管状的小泡与BPL融合，使病毒从该细胞中释放出来⑥。然后黄症病毒通过肠基板（basal lamina，BL）进入血腔⑦。最终，纳体（又称内体，endosome）成熟变为溶酶体（L），而且留在溶酶体内的任何病毒粒体均可能被降解。MT，微管。（B）黄症病毒与决定介体专化性传播的唾附腺（ASG）的相互作用。悬浮于血淋巴中的黄症病毒首先遇到围绕着ASG的胞外基板（BL）。BL对黄症病毒起着选择性屏障的作用。根据蚜虫的生物型和特定的黄症病毒，病毒粒体也许不能穿透BL（A）或者可通过（B，C）扩散进入基部质膜（BPL）。第二个选择性屏障存在于BPL。在BPL不受识别的黄症病毒粒体留在细胞外面的细胞周隙（pericellular space B）中。由BPL上的推定病毒受体C识别的黄症病毒被有被小窝②内吞并在细胞质中③积累成为管状小泡（TV）。与排列有微绒毛的导管（nicrovilli-lined canal）［由顶端质膜（APL）形成］毗邻的TV从（含有单个病毒粒体的）覆盖小泡（CV）出芽④。这些CV将病毒转运⑤到导管（canal）中，与APL融合⑥，形成有被小窝（CP），并将病毒释放进导管腔（canal lumen）中，使黄症病毒随着唾液的分泌从蚜虫体内转运出来。PLI，质膜凹陷；SD，唾液道。承蒙惠允，引自Gildow（1999）。

iii. 黄症病毒与介体的分子互作

因为提纯的黄症病毒经体外获毒后可以被蚜虫传播，很可能没有非外壳蛋白（non-capsid protein）的参与。衣壳由主要外壳蛋白和由外壳蛋白终止密码子通读产生的较大的次要外壳蛋白组成（参见第 7 章第 V 节 B.9）。在大部分黄症病毒科病毒中（除 PEMV 外），该通读蛋白的 C 端在一定程度上受到加工，其 C 端对蚜虫传播不是必需的（Gray and Banerjee，1999）。然而，仅仅含有主要 CP 而不含通读蛋白的粒体不能被蚜虫传播；这引出了一种假设，即通读蛋白对蚜虫传播是必需的。没有通读蛋白的粒体能够到达血腔，这表明它们穿过了肠壁的屏障。此外，将杆状病毒具有 CP 而缺乏通读蛋白的类似病毒粒体在昆虫细胞中表达，并注射进或饲喂给蚜虫，可观察到病毒粒体在附属唾腺细胞和唾液管中存在（Gray and Banerjee，1999）。

对 BWYV 的次要 CP 通读区的保守区域里或附近进行点突变会影响其蚜传能力（Brault *et al.*，2000）。蚜传能力在某些拟回复突变和第二位点突变的突变体上可以得到恢复。通过将病毒突变体显微注射进血腔发现，一个第二位点突变体恢复了病毒从血腔通过附属唾腺移动的能力，但是不能使病毒穿过分隔肠和血腔的表皮细胞。通读区域的不同特征在传播的不同阶段起作用。

还应该考虑黄症病毒与共生蛋白（symbionin）之间的互作（见下文）。因而，对某些受体介导识别的黄症病毒组分还没有较清楚的了解。

几种 31～85 kDa 的蚜虫蛋白质与提纯的黄症病毒属病毒可在体外发生互作（van den Heuvel，1999；van den Heuvel *et al.*，1999）。这两种蛋白质，P31 和 P44 的抗血清可以特异性地与介体蚜虫的附属唾腺提取物发生反应。这表明这些蛋白质可能参与黄症病毒属病毒对该位点的特异性识别。

iv. 共生蛋白

与很多黄症病毒以及其他病毒发生相互作用的另一个蚜虫结合蛋白是60 kDa的共生蛋白，即来自内共生（endosymbiotic）细菌（*Buchneria* spp.）的 GroEL。这种蛋白质很容易在蚜虫血淋巴中发现，它是与蛋白质结构稳定性相关的分子伴侣家族中的一员。黄症病毒与共生蛋白之间的互作由次要衣壳蛋白的通读区决定。将缺失 BWYV 通读区的突变体注射进蚜虫的血淋巴后发现，突变体病毒在血淋巴中的持续时间比非突变的粒体的短（van den Heuvel *et al.*，1997）。此外，用影响 *Buchneria* 并降低血淋巴中共生蛋白水平的抗生素处理桃蚜可以抑制传播，并可使血淋巴中的 CP 完整性丧失（van den Heuvel *et al.*，1994）。总之，这些发现都表明黄症病毒-共生蛋白之间的互作对病毒在血淋巴中的保持是必需的（van den Heuvel *et al.*，1999）。

v. 依赖性传播（Falk and Tian，1999）

黄症病毒科病毒。像某些非持久性病毒一样，一些持久性病毒在经蚜虫传播时需要有辅助病毒的存在。就依赖于其他病毒的持久性病毒而言，正是病毒自身在混合侵染中的存在提供了帮助。BYDV 是研究最详细的依赖性传播（dependent transmission）的持久性病毒。

黄症病毒科成员（包括 BYDV）间具有高度的介体特异性。例如，CYDV RPV 可以被禾谷缢管蚜（*Rhopalosiphum padi*）传播但不能被麦长管蚜（*Sitobion avenae*）传播，对 BYDV-MAV 而言则正好相反。病毒能够进入低效率的介体的血淋巴。因而，

传播的屏障在于病毒不能从血淋巴经过唾腺到达植物。当燕麦仅被 BYDV-MAV 侵染时禾谷缢管蚜不能传播病毒。然而，当 BYDV-MAV 和 CYDV-RPV 混合侵染植物时，病毒可以有规律地传播。当将两种病毒从各自的侵染植株上提纯出来，经浓缩混合后饲喂蚜虫，则仅能传播其平时特异性传播的一种植物病毒。提纯病毒的传播只能被同源的抗血清阻止。

当蚜虫被饲喂混合侵染的提纯病毒时，由桃蚜对 BYDV-MAV 的传播被 BYDV-MAV 的抗血清所阻止。然而，同样混合后，禾谷缢管蚜即可传播 BYDV MAV 也可传播 CYDV-RPV（Rochow，1970）。在饲喂蚜虫两种病毒侵染的叶片之前，Rochow 和 Muller（1975）给蚜虫注射株系特异性的抗血清。注射 BYDV-MAV 抗血清阻止了 BYDV-MAV 的传播。然而，注射了这种抗血清以后的禾谷缢管蚜可以传播 BYDV-MAV，并可以传播 CYDV-RPV。

假定这种依赖性传播是因为在混合侵染的植物中两种病毒的复制发生了表型混合（phynotypic mixing），就可以很好地解释这些实验以及一些其他实验的结果（参见第 8 章第Ⅹ节）。据推测 BYDV-MAV 基因组的一些拷贝被 CYDV-RPV 的外壳蛋白包裹后可以保护其不被 BYDV-MAV 的抗血清钝化。

田间经常发生 BYDV 株系与 CYDV 的混合侵染。将从美国和加拿大各地获得的与 BYDV-MAV 和 CYDV-RPV 类似的数种分离株混合后，依赖于禾谷缢管蚜（*R. padi*）而传播，这表明该现象可以影响病毒在田间的传播。

表型混合还可能在黄症病毒属的其他成员如 BWYV 上发生。

幽影病毒属病毒（umbraviruses）。在第 6 章（第Ⅶ节 H. 20）已经讲过幽影病毒不编码外壳蛋白。它们的蚜虫传播需要黄症病毒作为辅助病毒，黄症病毒可能提供外壳蛋白和蚜传成分。有 7 种幽影病毒属的重要病毒需要与黄症病毒属联合侵染（表 11.3）（Robinson and Murant，1999）。这个系统具有以下特性：①两种病毒以循回非增殖型方式传播；②依赖性病毒是汁液传播的，但辅助病毒不是；③依赖性病毒仅能从含有两种病毒的植物上被蚜虫传播，换言之，已经携带辅助病毒的蚜虫不能从仅被依赖性病毒侵染的植物上传播病毒；④许多实验证据表明，当依赖性病毒的 RNA 被辅助病毒蛋白组成的蛋白衣壳包裹后可以被蚜虫传播（Harrison and Murant，1984）；⑤依赖性病毒可以得到数种不同的黄症病毒的辅助。这种表型混合能在双重侵染的植物上发生。GRV 被豆蚜（*Aphis craccivora*）传播依赖于其卫星 RNA 和 GRAV（Murant，1990）。

类病毒（viroid）。尽管对于类病毒 PSTVd 是否被 PLRV 的外壳蛋白所包裹还不清楚，但在同时受到 PLRV 侵染的植株中，PSTVd 可与 PLRV 一起经蚜虫传播（Salazar *et al.*，1995；Singh and Kurz，1997）。

b. 矮缩病毒科病毒

矮缩病毒科病毒（nanoviruses）由蚜虫以持久循回方式传播。FBNYV 最短获毒时间是 15～30 min（Franz *et al.*，1998），而对 BBTV 而言要 4 h（Hu *et al.*，1996）。两种病毒的接毒时间均为 5～15 min，其介体在整个生活史均能传毒。矮缩病毒科病毒的持久性传播的不稳定性是由于其多分体的性质所致（Franz *et al.*，1998）。提纯的 FBNYV 不能被蚜虫传播，这表明它需要一种辅助因子（Franz *et al.*，1999）。

表 11.3 自然传播的幽影病毒-辅助病毒黄症病毒复合体

幽影病毒属病毒	黄症病毒辅助病毒	主要蚜虫介体
菜豆黄化镶脉病毒 (*Bean yellow veinbanding virus*)	菜豆卷叶病毒 (*Bean leaf roll virus*)	豌豆蚜 (*Acyrthosiphon pisum*)
胡萝卜斑驳病毒 (*Carrot mottle virus*)	胡萝卜红叶病毒 (*Carrot red leaf virus*)	伞形花二尾蚜 (*Cavariella aegopodii*)
胡萝卜拟斑驳病毒 (*Carrot mottle mimic virus*)	胡萝卜红叶病毒 (*Carrot red leaf virus*)	伞形花二尾蚜 (*C. aegopodii*)
花生丛簇病毒 (*Groundnut rosette virus*)	花生丛簇辅助病毒 (*Groundnut rosette assistor virus*)	豆蚜 (*Aphis craccivora*)
莴苣小斑驳病毒 (*Lettuce speckles mottle virus*)	甜菜西方黄化病毒 (*Beet western yellows virus*)	桃蚜 (*Myzus persicae*)
豌豆耳突花叶病毒 2 号 (*Pea enation mosaic virus 2*)	豌豆耳突花叶病毒 1 号 (*Pea enation mosaic virus 1*)	豌豆蚜 (*A. pisum*)
烟草斑驳病毒 (*Tobacco mottle virus*)	烟草扭脉病毒 (*Tobacco vein distorting virus*)	桃蚜 (*M. persicae*)

承蒙惠允，引自 Robinson 和 Murant (1999)。

2. 增殖型病毒

与许多以蚜虫为介体的持久循回型病毒不同，大部分持久增殖型病毒（propagative virus）是由叶蝉和飞虱传播的。然而，弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）的几种病毒包括 SYVV 和 LNYV 可以在介体莴苣超瘤蚜（*Hyperomyzus lactucae*）体内复制（Jackson *et al.*，1999）。

SYVV 在介体中的潜伏期很长，这主要取决于温度。在脑细胞的细胞核和细胞质中、食管下神经节（subesophageal ganglion）、唾腺、卵巢（ovary）、脂肪体（fat body）、菌胞体（含菌体，mycetome）以及肌肉中已经发现典型的杆菌状病毒粒体的存在（Sylvester and Richardson，1970）。病毒粒体很可能在核内装配。病毒可以通过血淋巴注射在蚜虫间连续传播，并且病毒侵染与蚜虫死亡率的提高相关。寿命的缩短因不同病毒分离株而异。然而，因为被侵染的蚜虫的寿命能够超过最大产幼虫期（period of maximum larviposition），种群增长的固有速率很少受影响（Sylvester，1973）。病毒可以经莴苣超瘤蚜的卵传播，约 1%的幼虫能够侵染植物（Sylvester，1969）。已经发现病毒可以在蚜虫细胞的原代培养物（primary culture）中增殖（Peters and Black，1970）。

通过机械接种，SYVV 在蚜虫体内连续继代转接（continuous passage）会使分离株失去侵染寄主植物的能力（Sylvester and Richardson，1971）。

类似的证据表明，与 BNYV 一样（Garrett and O'Loughlin，1977），LNYV 也可以在其蚜虫介体内复制（O'Loughlin and Chambers，1967）。推测病毒粒体在蚜虫细胞内产生然后释放到血淋巴，随后进入唾腺，通过唾液注射进植物体内。没有证据表明蚜虫获得两种不同的弹状病毒时会出现干扰或交互保护（Sylvester and Richardson，1981）。

通过针刺接种后SCV在蚜虫（*Chaetosiphon jacobi*）介体体内可以连续6次继代转接（Sylvester *et al.*，1974）。由于每次传播均要将原来的接种体稀释1000倍，这是病毒复制的有力证据。尽管被注射的蚜虫能很好地成活并有较长的寿命，它们的传毒能力在第10天时最大，然后快速下降（图11.12）。这可能是因为到达唾腺病毒浓度的降低，或是因为老龄蚜虫取食的减少。

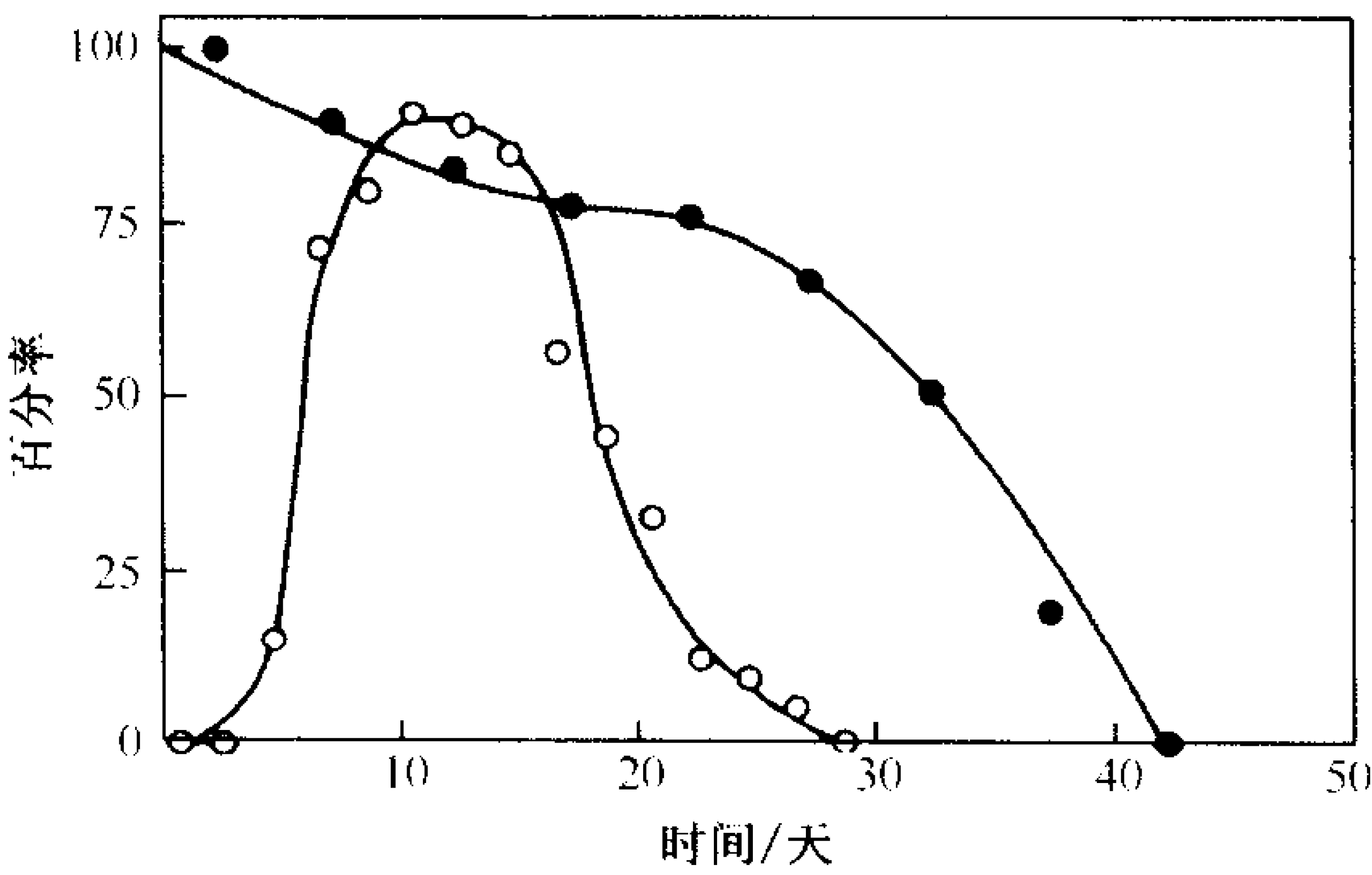


图11.12　在系列传代转接实验中，将草莓皱缩病毒（SCV）注射进蚜虫体内后，蚜虫的存活和传播曲线。注射病毒后蚜虫在被罩在长着健康草莓幼苗的生长箱内，生长箱内的设置条件为：温度为25℃，持续光照，每隔24～48 h将虫转移到新鲜幼苗上直到蚜虫死亡。存活曲线显示出每个连续4天的周期结束时还活着的蚜虫与开始时的212只蚜虫数目的百分比。传播曲线表示每隔48 h被这些昆虫取食、后来发病的苗与所有供试苗的比例。○-○，传播曲线；●-●，存活曲线。承蒙惠允，引自Sylvester等（1974）。

第Ⅳ节　叶蝉和飞虱（头喙亚目 Auchenorrhyncha）

A. 结构和生活史

与蚜虫不同，叶蝉的生活史比较简单，是由卵孵化成若虫（nymph），若虫期靠吮吸取食，再历经数次蜕皮变为成虫，一年可以有一代和多代。不同种采取的越冬方式有差异，有的以卵，有的以成虫，也有的以幼虫越冬。

叶蝉作为病毒传播介体其结构上的重要性毋庸多言。图11.13显示的是叶蝉的主要器官头部和胸部的纵剖面图。唾腺（salivary gland）对于病毒的传播非常重要，它是由一个四裂状基本腺体和一个附属腺体组成的，含有5种不同的腺泡（acinus）。

菌胞体（含菌体）作为单独的群体出现在腹腔的两侧。可能具有储存功能的肥胖躯体包围着所有的器官，呈现出头（head）、胸（thorax）和腹（abdomen）。消化道划分为3个主要区：前肠（foregut）、中肠（midgut）和后肠（hindgut）(图11.14)。Markham等（1988）和Mesfin等（1995）报道了关于叶蝉类取食行为的研究方法。Mesfin等（1995）研究表明玉米叶蝉（*Cicadulina mbila*）的取食行为与蚜虫相似，唾液鞘包裹着口器，能够穿透所取食寄主的韧皮部。

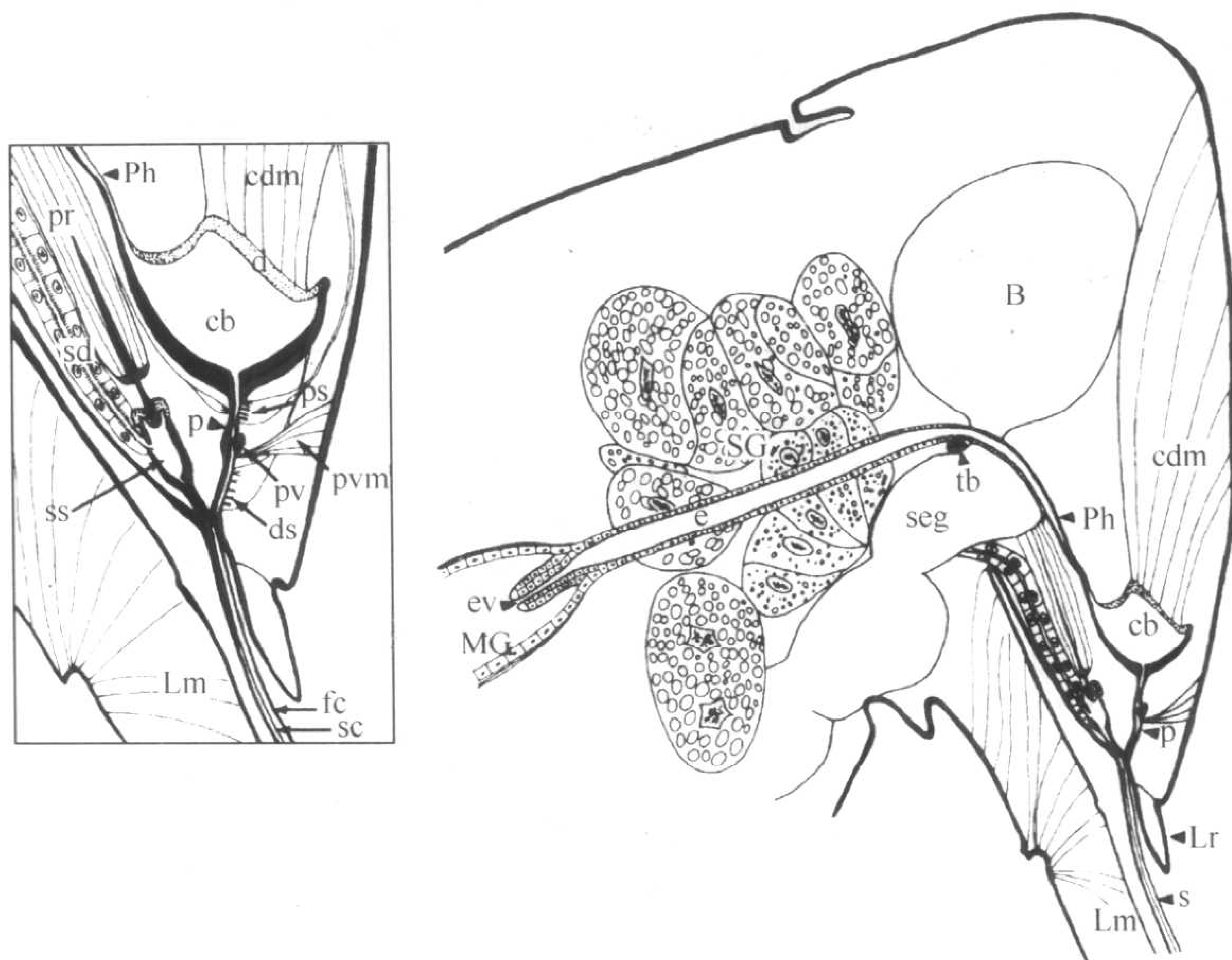


图11.13 叶蝉(*Graminella nigrifrons*)头部的纵切面图，显示前消化道、唾腺系统及周围结构。B，脑(brain)；cb，食窦(cibarium)；cdm，食窦扩张肌(cibarial dilator muscle)；d，食窦横膈(cibarial diaphragm)；ds，端感器(distal sensillia)；e，食道(esophagus)；ev，食道瓣(esophageal valve)；fc，食物道(food canal)；Lm，下唇(labium)；Lr，上唇(labrum)；MG，中肠(midgut)；p，前食窦(precibarium)；Ph，咽(pharynx)；pr，活塞牵缩肌(piston retractor muscle)；ps，基感器(proximal sensilla)；pv，前食窦瓣(precibarial valve)；pvm，前食窦瓣肌(precibarial valve muscle)；s，口针(stylet)；sc，唾液道(salivary canal)；sd，唾(腺导)管(salivary duct)；seg，食管下神经节(subesophageal ganglion)；SG，唾腺；ss，唾腺注射器(salivary syringe)；tb，幕骨臂。承蒙版权所有者(© Annual Reviews，www. AnnualReviews. org)惠允，引自 Nault 和 Ammar (1989)。

B. 病毒与介体的关系

由叶蝉以非持久性方式（non-persistent manner）传播或纯粹以机械方式（mechanical mean）传播的病毒尚未发现。一些以半持久性方式传播的病毒，在叶蝉的前消化道（anterior alimentary canal）或前肠的内表皮衬层（cuticular lining）存在有病毒状的粒体附着其上（Nault and Ammar，1989）。叶蝉传病毒通常仅由一个或少数几个近缘种传播。

叶蝉科包括 60 个亚科，其中在圆痕叶蝉亚科（Agalliinae）和角顶叶蝉亚科（Deltocephalinae）两个亚科中含有作为病毒介体的种类。圆痕叶蝉亚科取食草本的双子叶植物，而角顶叶蝉亚科则取食单子叶植物。在大约 2000 个属中，已经报道的有15 000 个种，其中作为病毒介体被报道的仅有 21 个属的 49 个种（Nault and Ammar，1989）。

樗鸡总科（Fulgoroidea）约有 20 个科，但仅在飞虱科（Delphacidae）中有确定的病毒介体种。飞虱科（Delphacidae）的成员取食单子叶植物，主要是禾本科（Poaceae）的成员，使谷类作物产生严重的病害，其中包括水稻、小麦和玉米。Nault 和 Ammar

(1989) 以及 Nault (1997) 综述了叶蝉类对植物病毒的传播，病毒与介体的进化关系将在第 17 章的第 XIV 节进行讨论。

C. 半持久性方式传播

玉米褪绿矮缩病毒 (MCDV) 和水稻东格鲁球状病毒 (RTSV) 是以半持久性方式传播的。RTSV 与水稻东格鲁杆状病毒 (RTBV) 一起传播，导致东格鲁病 (参见第 2 章第Ⅲ节 A. 6)。由叶蝉 (*Graminella nigrifrons*) 传播的 MCDV，最短获毒时间和接种时间均为 15 min (Choudhury and Rosenkranz, 1983)，由二点黑尾叶蝉 (*Nephotettix virescens*) 传播的 RTSV 分别为 5～30 min和 5～10 min (Anjaneyulu *et al.*, 1994)。获毒时间越长这两种病毒的传播概率就越高。最短获毒时间是指叶蝉穿透大多数病毒所在的韧皮部细胞所需要的时间。具有侵染活性的 MCDV 在 25℃ 的条件下离开介体不到 24 h 就会失活，但在低温条件下侵染性可保持数天 (Nault and Ammar, 1989)。若虫蜕皮后对 MCDV 的传播能力也随之丧失，雄性和雌性成虫均为 MCDV 和 RTSV 的介体，但雌虫的传毒效率较高 (Choudhury and Rosenkranz, 1983; Anjaneyulu *et al.*, 1994)。

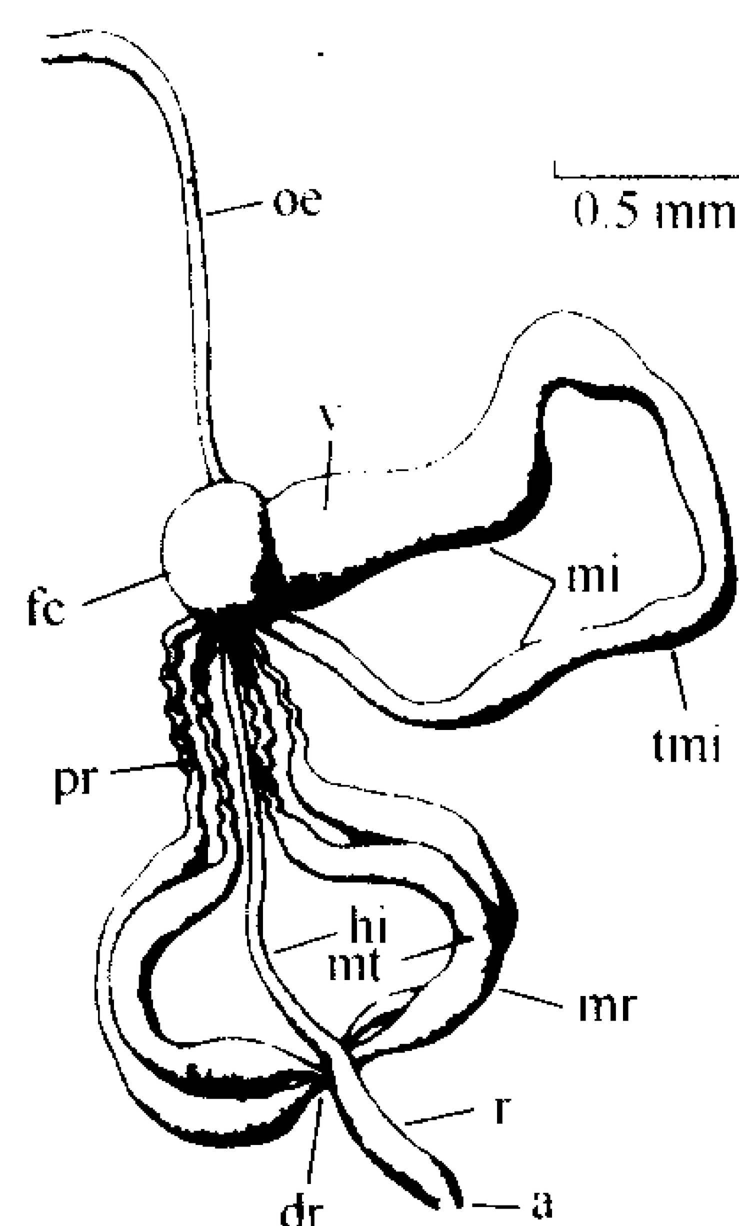


图 11. 14 叶蝉 (*Agallia constricta*) 的消化系统。a、肛门 (anus); r、直肠 (rectum); dr、端区 (distal region); mr、中区 (middle region); mt、马氏管 (Malpighian tubule); hi、后肠 (hind intestine); pr、基区 (proximal region); tmi、管状中肠 (tubular mid-intestine); mi、中肠 (mid-intestine); v、胃 (ventriculus); fc、滤室 (filter chamber); oe、食道 (esophagus)。引自 Gil-Fernandez 和 Black (1965)。原图后来由 Black 做过修改，以求与 Bharadwaj 等 (1966) 的研究发现一致。承蒙 L. M. Black 惠允。

通过电镜观察到 MCDV 病毒粒体附着在介体前肠的表皮内膜层，病毒粒体黏附在前食窦 (precibarium)、食窦 (cibarium)、咽 (pharynx) 和前食道 (fore-esophagus) 的表皮内膜 (cuticular lining) 上 (Nault, 1997) (图 11. 15)。在贲门瓣 (cardiac valve) 后面的消化道或其他组织以及口针和口针尖部都没有发现病毒粒体的存在 (Childress and Harris, 1989)。叶蝉在取食期间不断地从前肠排泄出外渗物，据认为这是植物受到病毒接种的过程 (Wayadande and Nault, 1992)。因此，病毒由叶蝉以半持久性方式的传播可能采取摄食-排泄 (ingestion-egestion) 的方式。

MCDV 和 RTSV 的传播可能需要像马铃薯 Y 病毒属病毒编码的辅助蛋白的参与，但所取得的证据并非直接的证据 (Hibino and Cabauatan, 1987; Hunt *et al.*, 1988; Creamer *et al.*, 1993)。据认为 RTSV 的辅助组分有助于与 RTBV 的共同传播。

D. 持久性传播

持久性传播需要被吸入的病毒移动到唾腺。与在蚜虫介体内一样，持久性传播的病毒有些在叶蝉体内复制 (增殖型)，而有些则不复制 (循环型)。

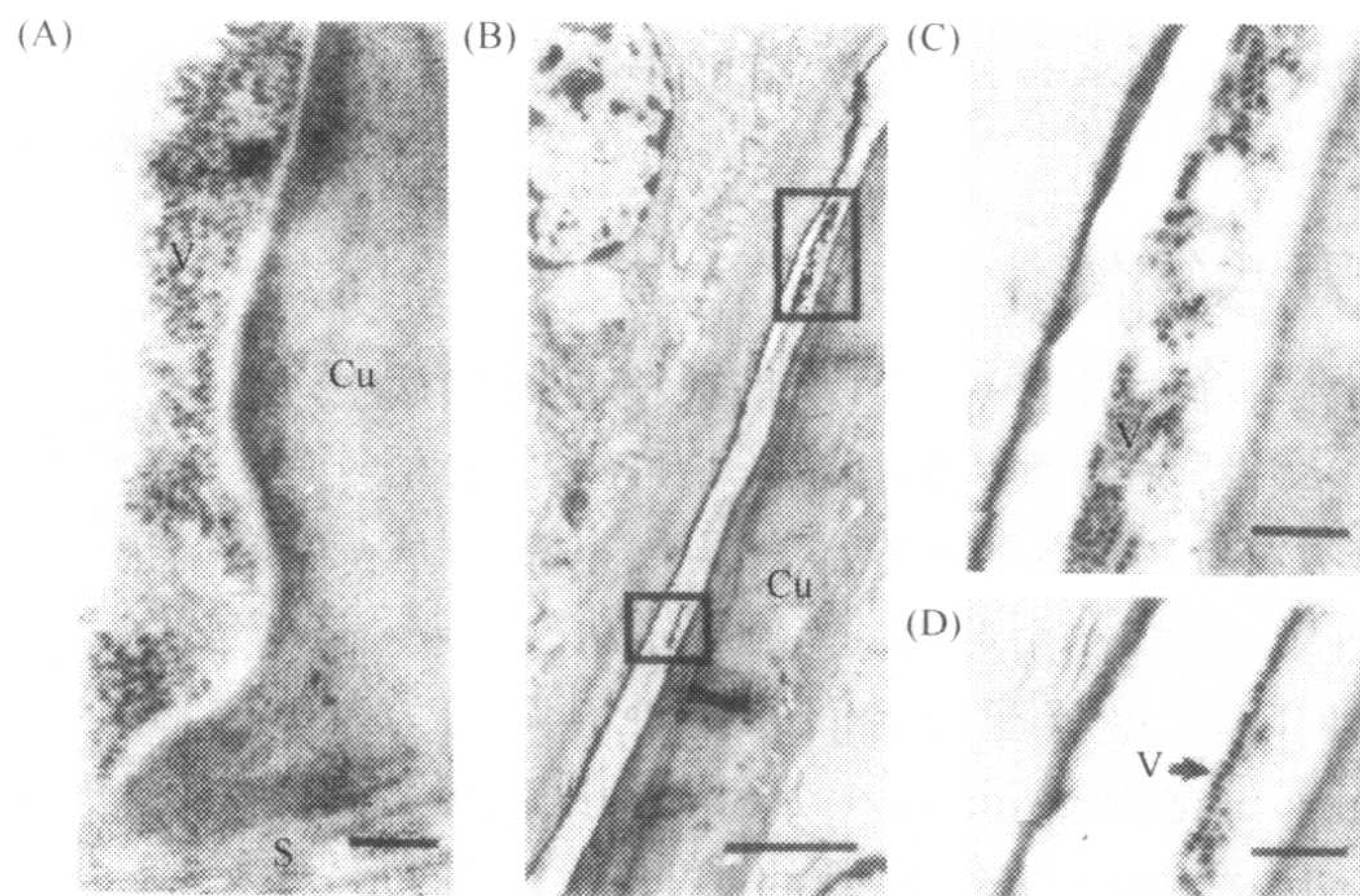


图11.15 在有接种能力的叶蝉(*Graminella nigrifrons*)体内镶嵌于致密基质中的类似 MCMV 的粒子(V)电镜照片。附着于前食窦表皮内膜(Cu)的粒子;(B)、(C)、(D)附着在咽部的粒子。(B)中方框内的区域在(C)和(D)内放大。S,前食窦感器。参见图11.13叶蝉头部的结构。(A)、(C)和(D)中的比例尺代表 200 nm,(B)中代表 2 μm。承蒙版权所有者(© Annual Reviews, www.AnnualReviews.org)惠允,引自 Nault 和 Ammar(1989)。

1. 循环型病毒

双生病毒科中有两个属的病毒[玉米线条病毒属病毒(mastreviruses)和曲顶病毒属病毒(curtoviruses)]由叶蝉以持久性循环型方式传播,而番茄伪曲顶病毒(TPCTV)是由角蝉(treehopper)以这种方式传播的。由叶蝉传播的各种双生病毒都有其基本的传播介体,如甜菜曲顶病毒(BCTV)、玉米线条病毒(MSV)和小麦矮缩病毒(WDV)的基本叶蝉介体分别为甜菜叶蝉(*Circulifer tenellus*)、玉米叶蝉(*Cicadulina mbila*)和异沙叶蝉(*Psammotettix alienus*)。

获毒时间从几秒钟到 1 h 不等,取食时间越长,传播率就越高,在介体内持续时间也越长(Goodman,1981;Harrison,1985)。所研究的 10 个循环型病毒的潜伏期平均为(23±4.1)h(Nault,1991),这一时间大概是病毒到达唾腺所需的时间。玉米线条病毒(MSV)仅出现在受侵染植物的叶肉细胞内,韧皮部中却未发现,其介体通常取食韧皮部,但更偏爱玉米线条病毒(MSV)已经侵染的植物叶肉细胞。介体的取食行为对于玉米线条病毒(MSV)的传播是非常关键的。

Markham(1992a;1992b)研究了 MSV 在叶蝉(*C. mbila*)体内的运动,MSV 由受体介导的内吞作用经过中肠的滤室(filter chamber)和前室(anterior cell)到达血腔(hemocoel)。受体将病毒导入唾腺与导入中肠的机制不同。叶蝉属(*Cicadulina*)的一些种因缺少肠部受体而将病毒保留在唾腺内,它们不能从口器获得病毒,但在病毒进入血腔后能够传播。

叶蝉传播的病毒,主要致病性决定子是病毒的外壳蛋白。Briddon 等(1990)将叶蝉传播的甜菜曲顶病毒(BCTV)外壳蛋白基因替换为粉虱(whitefly)传播的非洲木

薯花叶病毒（ACMV）的外壳蛋白基因，重组病毒用农杆菌介导接种到植物中，再由叶蝉传播，结果产生了非洲木薯花叶病毒（ACMV）导致的发病症状。

2. 增殖型传播

植物病毒有4个科属中的成员能够在叶蝉/飞虱（hopper）介体中复制（表11.4）。值得注意的是弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）和呼肠病毒科（*Reoviridae*）中有侵染动物的成员和侵染植物的成员，其中植物病毒成员被认为是侵染植物的虫媒（节肢动物介体）病毒（arboviruses）即植物虫媒病毒（phytoarboviruses）（Whitcombe and Davies，1970）。来自4个科属的13种增殖型病毒的潜育期为（368±41）h（Nault，1991）。与循环型病毒相比，增殖型病毒的潜育期如此长的原因还不是很明确，但可能与病毒在传播前需要复制有一定关系（Ammar，1994）。

表11.4　根据传播方式、病毒分类与介体科归类的头喙亚目昆虫传播的植物病毒和介体属

传播方式和病毒属（组）	介体科	病毒	介体属
前肠传播			
玉米褪绿斑驳病毒属（*Machlomovirus*）	叶蝉科（Cicadellidae）	玉米褪绿矮花病毒（MCDV）	*Graminella* 及其他6属
伴生病毒属（*Sequivirus*）	叶蝉科（Cicadellidae）	水稻东格鲁球状病毒（RTSV）	*Nephotettix*、*Recilia*
循回型			
玉米线条病毒属（*Mastrevirus*）	叶蝉科（Cicadellidae）	玉米线条病毒（MSV）	*Cicadulina*
		黄瓜矮化斑驳病毒（CSMV）	*Nesoclutha*
		雀稗条点花叶病毒（PSMV）	*Orosius*
		烟草黄矮病毒（TYDV）	*Nesoclutha*
		小麦矮缩病毒（WDV）	*Psammotettix*
曲顶病毒属（*Curtovirus*）	叶蝉科（Cicadellidae）	甜菜曲顶卷叶病毒（BCTV）	*Circulifera*
番茄伪曲顶病毒属（*Topocuvirus*）	角蝉科（Membracidae）	番茄伪曲顶病毒（TPCTV）	*Micrutalis*
增殖型			
玉米细条病毒属（*Marafivirus*）	叶蝉科（Cicadellidae）	玉米细条病毒（MRFV）	*Dalbulus* 及其他3属
		燕麦蓝矮病毒（OBDV）	*Macrosteles*
细胞核弹状病毒属（*Nucleorhabdovirus*）	叶蝉科（Cicadellidae）	禾谷类褪绿斑驳病毒（CCMoV）	*Nesoclutha*、*Cicadulina*
		燕麦条点花叶病毒（OSMV）	*Graminella*
		马铃薯黄矮病毒（PYDV）	*Aceratagallia*[b]、*Agallia*[b]、*Agalliopsis*[b]
		水稻黄矮病毒（RYSV）	*Nephotettix*
	飞虱科（Delphacidae）	芋瘦小病毒（CBDV）	*Tarophagus*
		指状粟花叶病毒（FMMV）	*Sogatella*、*Perigrinus*
		玉米花叶病毒（MMV）	*Peregrinus*
		玉米不育矮化病毒（MSSV）	*Sogatella*、*Perigrinus*
		小麦褪绿线条病毒（WCSV[a]）	*Laodelphax*
		小麦丛矮病毒（WRSV）	*Laodelphax*

续表

传播方式和病毒属（组）	介体科	病毒	介体属
增殖型			
细胞质弹状病毒属（*Cytorhabdovirus*）	叶蝉科（Cicadellidae）	美洲小麦条点花叶病毒（WASMV）	*Endria*、*Elymana*
	飞虱科（Delphacidae）	大麦黄条点花叶病毒（BYSMV）	*Laodelphax*
		北方禾谷花叶病毒（NCMV）	*Laodelphax*、*Muellerianella*、*Ribautodelphax*、*Unkanodes*
未归属的弹状病毒	叶蝉科（Cicadellidae）	SSMV	*Graminella*
		俄罗斯冬小麦花叶病毒（WWMV[a]）	*Psammotettix*
	飞虱科（Delphacidae）	CynCSV	*Toya*
		马唐条点病毒（DiSV）	*Sogatella*
		鸢尾轻型花叶病毒（IMMV）	*Ribautodelphus*
纤细病毒属（*Tenuivirus*）	飞虱科（Delphacidae）	水稻条纹病毒（RSV[a]）	*Laodelphax*、*Terthron*、*Unkanodes*
		玉米条纹病毒（MSpV[a]）	*Peregrinus*
		水稻草状矮化病毒（RGSV）	*Niloparvata*
		水稻白叶病毒（RHBV[a]）	*Sogatodes*
		欧洲小麦条点花叶病毒（EWSMV[a]）	*Javesella*
植物呼肠病毒属（*Phytoreovirus*）	叶蝉科（Cicadellidae）	伤瘤病毒（WTV[a]）	*Agallia*[b]、*Agalliopsis*[b]、*Aceratagallia*[b]
斐济病毒属（*Fijivirus*）	飞虱科（Delphacidae）	水稻矮缩病毒（RDV[a]）	*Nephotettix*、*Recilia*
		水稻瘤矮病毒（RGDV[a]）	*Nephotettix*、*Recilia*
		斐济病病毒（FDV[a]）	*Laodelphax*、*Delphacodes*、*Javesella*
		玉米粗缩病毒（MRDV[a]）	*Sogatella*
		燕麦不育矮缩病毒（OSDV[a]）	*Javesella*、*Dicranotropis*、*Ribautodelphax*
		马唐矮化病毒（PaSV）	*Sogatella*
		水稻黑条矮缩病毒（RBSDV）	*Laodelphax*、*Unkanodes*
水稻病毒属（*Oryzavirus*）	飞虱科（Delphacidae）	水稻齿叶矮缩病毒（RRSV）	*Niloparvata*
		稗草齿叶矮缩病毒（ERSV）	*Sogatella*

注：a. 跨代（经卵巢）传播（transovarial transmission）在某些介体中已有报道。

b. 来自圆痕叶蝉亚科（Agalliinae）的属；所有其他叶蝉（cicadellids）均来自角顶叶蝉亚科（Deltocephalinae）。承蒙版权所有者（© Annual Reviews，www. AnnualReviews. org）惠允，引自 Nault 和 Ammar（1989）。

a. 呼肠病毒科（*Reoviridae*）

证明植物病毒在动物介体内复制的经典试验是利用植物呼肠病毒及其介体叶蝉完成的。这一领域的早期工作曾引起相当大的争议，Black（1984）对此进行了总结。病毒在叶蝉介体内的复制的主要证据有以下 4 点：①继代传播和稀释试验；②在稀释约 10^{-18}倍后显示传播的系列注射试验；③病毒和病毒抗原的生长曲线；④病毒在昆虫体内的定位试验。

植物呼肠病毒属（*Phytoreovirus*）的病毒是由叶蝉传播的，而斐济病毒属病毒（fijiviruses）和水稻病毒属病毒（oryzaviruses）由飞虱传播。植物呼肠病毒的潜育期

(incubation) 通常 1～3 周，在这一时期，病毒进行复制并侵染更多的组织，病毒传播的能力似乎与到达唾腺的数量相一致。叶蝉/飞虱在其后一直保持侵染性，直到生命的终止。Conti (1984) 给出了病毒传播中 3 个阶段的最短有效时间，但传播效率非常低。例如，仅 15%的甘蔗扁角飞虱（*Perkinsiella saccharicida*）在侵染含有斐济病病毒（FDV）抗原的甘蔗后，仅 6%传播该病毒（Francki *et al.*，1986c）。已有研究表明，一些（但不是所有的）植物呼肠病毒通过介体的卵传播，通常传毒率很低。不过，继代传播对于病毒的生态是很重要的（第 12 章）。

Omura 和 Yan (1999) 综述了植物呼肠病毒（phytoreoviruses）传播过程中病毒与介体的互作。有人研究了水稻矮缩病毒（RDV）在介体单层细胞和黑尾叶蝉（*Nephotettix cincticeps*）体内的传播。用 CCl_4 处理病毒粒体去除外层的次要外壳蛋白 P2（参见第 6 章第Ⅵ节 A 中的呼肠病毒蛋白），这样就使得病毒侵染单层细胞和介体通过体外饲喂获毒的能力丧失。P2 在病毒粒体与介体细胞的相互作用中起附着作用，缺少 P2 时不影响复制的起始。当缺少 P2 的病毒粒体被注射进叶蝉时，叶蝉受到感染并能够传播病毒。这些实验表明 P2 起着病毒与昆虫介体的肠道互作的作用。如果采用注射的方法，病毒能够在介体中受感染的细胞内自我复制产生含有 P2 的全能病毒粒体。延长 RDV 和伤瘤病毒（WTV）无性繁殖时间导致介体传毒能力的丧失。丧失传播能力的 RDV 粒体丢掉了 P2，WTV 丢掉了 P2 和 P5。也有证据表明 RDV 的主要外壳蛋白 P8 参与病毒与介体的互作，当用 P8 的抗血清处理时，病毒的传播受到阻碍。

水稻病毒属的水稻齿叶矮缩病毒（RRSV）39 kDa 刺突蛋白参与病毒与介体的互作（Zhou *et al.*，1999）。在褐飞虱（*Niloparvata lugens*）介体取食受侵染的水稻植株前，用在细菌中表达的长钉蛋白饲喂，这种预先饲喂的 39 kDa 蛋白质完全抑制了飞虱传播病毒的能力。该 39 kDa 蛋白质与昆虫细胞膜上 32 kDa 蛋白质的结合表明，39 kDa 蛋白质可能涉及受体位点。

b. 弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）

Jackson 等（1999）总结了弹状病毒科中关于植物弹状病毒的研究工作。其中 15 个病毒成员是以飞虱（delphacid）或叶蝉（cicadellid）为介体，但这两类昆虫不能同时作为一种病毒的介体。

利用上述呼肠病毒科（*Reoviridae*）的试验方法研究了 *Rhabdoviridae* 的植物弹状病毒成员在叶蝉/飞虱介体中的复制。Chin 等（1970）应用荧光抗体染色显示，在侵染后不久培养的圆痕叶蝉（*Agallia constricta*）细胞核中就有马铃薯黄矮病毒（PYDV）抗原的积累。带有核衣壳的成熟病毒粒体已经可以在电镜下观察到。

PYDV 在介体的单层细胞培养的生长曲线表明在 28℃ 条件下前 9 h 是隐蔽期（eclipse period），在 9～29 h 之间，病毒含量每 80min 就增加 1 倍，接下来保持稳定状态（Hsu and Black，1974）。

最短获毒时间因不同病毒而异，变动幅度为从不到 1～15 min。弹状病毒较长的获毒时间可能与被限制在韧皮部细胞或邻近的细胞内有关。潜育期可能是几天或数月。例如，在 30℃ 条件下 SSMV 最短获毒时间为 6 h，最短潜育期为 9 天，最短接种时间为 1 h(Creamer *et al.*，1997)。

这种病毒介体的特异性非常高，甚至同种病毒的不同株系也具有特异性。暴露于病毒粒体表面的G（glycosylated）蛋白（糖基化蛋白）与介体传播的特异性有关（Jackson *et al.*，1987）。在侵染脊椎动物的弹状病毒中G蛋白起着识别和附着寄主细胞识别位点的作用，对SYDV的G蛋白研究证明了这一点，G蛋白的特异抗体阻碍了SYDV对介体单层细胞的侵染（Gaedigk *et al.*，1986）。

弹状病毒在植物体内的长期增殖会导致其由飞虱或叶蝉（hopper）介体传播特性的丧失。

c. 纤细病毒属病毒

纤细病毒属病毒（tenuiviruses）是由飞虱以持久性增殖型方式传播的（Falk and Tsai，1998）。病毒获毒时间为15 min～4 h。潜育期为4～30天，在此期间介体不能传播病毒，接下来的介体生活史中都具有传毒的能力，接种时间短则30 s，但通常是几分钟到数小时。若虫的传毒效率比成虫要高，雌虫比雄虫的传毒效率高。传毒效率随介体的种群或生物类型的不同而有差异，通过有选择的杂交繁殖可以获得传毒效率为0～100%不等的杂种群体。除水稻草状矮化病毒（RGSV）外，所有的纤细病毒都跨代传播，最高可达40代，传毒效率为20%～100%。有报道水稻白叶病毒（RHBV）通过介体的父系传播。

纤细病毒属病毒可以侵染飞虱的各个器官，包括脑、消化道、呼吸道、生殖系统、唾腺、马（尔皮基）氏管（Malpighian tubule）、腿部肌肉和肥胖的躯干，对介体引起温和的致死效应。这些致死效应包括生育力的下降、带毒雌虫的寿命缩短、卵和若虫的致死。

关于纤细病毒与介体互作的分子基础知之甚少。其基因组与番茄斑萎病毒属病毒（tospoviruses）以及布尼亚病毒科其他病毒属病毒的相似性（参见第2章第Ⅲ节H）表明病毒粒体与细胞膜作用，病毒编码的糖蛋白（glycoprotein）参与受体介导的互作。然而，还没有发现病毒粒体的包膜，关于预测的糖蛋白也未见报道。玉米条纹病毒（MSpV）基因的表达在植物和昆虫体内有些不同。NCP及其mRNA仅在植物中表达，这是否影响植物对NCP的特异作用还不清楚。

d. 玉米细条病毒属病毒

玉米细条病毒（MRFV）主要介体是玉米黄翅叶蝉（*Dalbulus maidis*），已有研究表明病毒在介体中的复制。尽管通过酶联免疫吸附分析（ELISA）检测到80%的介体可以被侵染，但仅有10%～34%能够传播病毒。传毒能力是受遗传控制的，因为传毒介体的比例可以通过选择性育种得到迅速提高（Gamez and Léon，1988）。在经过几代随机的异型杂交（outcross）后，传毒能力又回复到正常水平。因此，传毒能力较高的介体可能是稀有的，在异型杂交中正在受到迅速稀释的等位基因的隐性纯合体。有证据表明该病毒在受侵染的昆虫器官中广泛存在。该病毒导致的细胞病理学效应尚无报道（Gamez and Léon，1988）。

e. 病毒复制和传播的影响因子

病毒能够在取食免疫寄主的传播介体内增殖，虫卵可以越冬，为春季的健康作物提供毒源。因此，病毒在介体内的持久性和跨世代传播，以及影响传毒效率的因子具有相当高的经济价值。

i. 介体的龄期

对于试验的几种叶蝉而言，若虫比成虫的传毒能力高，成虫的传毒能力随虫龄的增长而降低。例如，Sinha (1967) 监测了叶蝉 *A. constricta* 获毒饲喂 1 天后 WTV 抗原的出现情况。在侵染后 32 天，被侵染的若虫中有 50%的个体在血淋巴 (hemolymph) 和唾腺中存在 WTV 抗原。而成虫被侵染的个体中仅有 5%在上述组织中有抗原的出现，抗原仅局限于肠道过滤腔内的初始侵染位点，并且抗原的扩散比若虫被侵染的个体中受到更大的限制。这些试验表明，随着介体的生长，肠道愈发变得难以侵染，出现在成虫的过滤腔内的病毒不能够进入体腔。

ii. 侵染后时间

Slykhuis (1963) 研究表明胭脂叶蝉 (*Endria inimica*) 在侵染多天后传播美洲小麦条点花叶病毒 (WASMV) 的能力丧失。一些个体可间歇性传播病毒，但在 72 天后全部失去侵染性。

iii. 温度

Sinha (1967) 研究了温度的升高对 WTV 在圆痕叶蝉 (*A. constricta*) 体内扩散的影响。在 27℃条件下对多组虫蛹获毒饲喂 1 天，再保持 3 天，以便病毒侵染进入过滤腔，这一阶段在过滤腔中发现病毒抗原。之后，一组继续保持在 27℃、另一组在 36℃条件下。高温抑制了病毒从肠道向血淋巴、唾腺和肠道其他部位的扩散。6 天后，在 60%的介体中发现抗原从过滤腔内消失。

温度对 RSV 在介体稻灰飞虱 (*Laodelphax striatellus*) 中的继代传播有显著的影响。在 17.5℃条件下，83%的带毒雌虫以 90%以上的比率传给子代，在 32.5℃条件下，仅有 12.5%的雌虫能够以如此高的比率传给子代 (Raga *et al.*, 1988)。

iv. 叶蝉的遗传变异

在介体的一个种内不同的系 (line) 或宗 (race) 的传毒效率可能存在普遍的变异，为更有力地说明一个种不单是一个介体，有必要对来自发生病毒的不同地区的介体进行检测。

v. 病毒特性的变化

如前所述，若 WTV 和弹状病毒在寄主植物中长期增殖而不经叶蝉的传播，可能会导致传播能力的丧失。

第Ⅴ节　粉虱 (Aleyroididae 粉虱科)

3 个病毒属的病毒是由粉虱传播的。它们是双生病毒科 (*Geminiviridae*) 的菜豆金色花叶病毒属 (*Begomovirus*) 病毒、长线病毒科 (*Closteroviridae*) 的毛形病毒属 (*Crinivirus*) 病毒和长线病毒属 (*Closterovirus*) 的一些病毒。这些病毒多数是在热带和亚热带地区发现的。

A. 粉虱

菜豆金色花叶病毒属病毒是由烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 专化性传播的，而长线病毒属病毒和毛形病毒属病毒的传播介体为温室粉虱。*Trialeurodes vaporariorum*

（BPYV、TICV 和 CCSV）、*T. abutilonea*（DVCV 和 AYV）、烟粉虱（CYSDV 和 SPSVV）以及 *B. argentifolia*（LCV）传播。

研究最多的介体是烟粉虱（*B. tabaci*），它对于几种主要病害的流行非常重要。仅仅一龄期的幼虫即可移动，但移动得不远，成虫能够飞，一年可繁殖多代。烟粉虱的蛹期取食韧皮部，B 型烟粉虱有时称为 *B. argentifolia*，经常作为介体。

Gill（1990）总结了粉虱的普通形态，Rosell 等（1995）详细研究了烟粉虱口器的亚显微结构。粉虱成虫的口器与其他同翅目昆虫（homopteran）尤其是蚜虫的口器相似，由上唇（labrum）、下唇（labium）和口针（stylet）组成。口针束由两个上颚口针（mandibular stylet）和两个下颚口针（maxillary stylet）构成，是取食的器官。粉虱的取食行为与蚜虫相似，包括刺、吸以及唾液鞘的形成（Janssen *et al.*，1989）。

B. 菜豆金色花叶病毒属病毒

大多数二分体的菜豆金色花叶病毒属病毒（begomoviruses）以持久循环型方式传播，在粉虱肠道的上皮细胞（epithelial cell）和唾腺内都观察到病毒粒体，因此被认为该属病毒在介体内的循环路线与黄症病毒（luteoviruses）相似（Cohen and Antignus，1994；Hunter *et al.*，1998）。与蚜传循环型病毒（第Ⅲ节 H. 1. a）的 GroEL 一样，共生蛋白（symbionin）的存在表明 TYLCV 在粉虱内的循环型传播（Morin *et al.*，1999）。但是，外壳蛋白不能和共生蛋白结合（Morin *et al.*，2000）并不是 AbMV 的传播能力丧失的原因。

菜豆金色花叶病毒属病毒的复杂性已有报道（Gray and Banerjee，1999）。TYLCV 在粉虱介体中侵染活性的持续时间似乎比预期的要长，已有继代传播的报道。SCLV 病毒粒体与某些介体组织的病理性畸形有关，且对介体的生物学和繁殖起着决定性的影响。研究资料表明这些病毒处于复制型状态，但没有检测到复制中间体的存在。TYLCV-Is 的传播是从雌虫到雄虫和从雄虫到雌虫的有性传播（Ghanim and Czosnek，2000）。

与黄症病毒属病毒的持久性传播一样，菜豆金色花叶病毒属病毒进出唾腺至少要越过肠壁和细胞膜两重屏障，可能采取由受体介导的策略。压片印迹（squashblot）显示，ACMV 可以侵染两个非传播介体，温室粉虱（*T. vaporariorum*）和桃蚜（*M. persicae*）（Liu *et al.*，1997），这一结果表明 ACMV 能够穿过肠壁，但不能进入唾腺。因为没有检测到脱壳的病毒核酸，所以认为病毒外壳蛋白对于获毒过程是必需的（Azzam *et al.*，1994）。通过构建粉虱可传的 ACMV-Nog 分离株的基因组和粉虱不可传的 ACMV-K 分离株基因组的嵌合体，Liu 等（1997，1998）证明了影响传播能力丧失的是 ACMV-K 分离株的外壳蛋白和 DNA-*BC1* 基因。*BC1* 基因被认为通过介导病毒的细胞间扩散（参见第 9 章第Ⅱ节 D. 2. i），而影响病毒在寄主组织内的分布。TYLCV 的粉虱可传和不可传分离株的外壳蛋白序列的比较和突变试验表明，外壳蛋白中第 129～134 位氨基酸之间的区域是病毒粒体的正确装配所必需的（Norris *et al.*，1998）。与此相反，ACMV 和 SLCV 并不越过非传播介体 *B. tabaci* 的肠壁这一屏障（Rosell *et al.*，1999）。

C. 长线病毒属（*Closterovirus*）和毛形病毒属（*Crinivirus*）

粉虱传播的单分体的长线病毒属病毒（closteroviruses）和双分体的毛形病毒属病毒（criniviruses）都是经前肠以半持久方式传播的。莴苣侵染性黄化病毒（LIYV）在介体内保持最长时间为 3 天，而莴苣褪绿病毒（LCV）和南瓜黄色矮化失调病毒（CYSDV）分别为 4 天和 9 天。与蚜虫传播的长线病毒属病毒 BYV 和 CTV（见第Ⅲ节 F.1）一样，LIYV 编码两种外壳蛋白，主要外壳蛋白（CP）和次要外壳蛋白（CPm）（参见第 6 章第Ⅷ节 F.2），且 CPm 也是存在于病毒粒体的一端（图 5.12）（Tian *et al.*，1999）。纯化的 LIYV 粒体能够由烟粉虱在体外获得后传播，并且 LIYV 的传播受到 CPm 抗血清的抑制，而不受 CP 抗血清的影响。因此，CPm 参与了 LIYV 的传播（Tian *et al.*，1999）。

第Ⅵ节　蓟马（缨翅目）

在大约 5000 种蓟马中，仅有蓟马科（Thripidae）的 10 个种是植物病毒的介体（Ullman *et al.*，1997）（表 11.5）。大多数蓟马是极端杂食性的，并且能够在广范围的寄主中繁殖。烟蓟马（*Thrips tabaci*）是世界性的害虫，可取食 40 多个科的至少 140 个植物种，主要以单性繁殖。幼虫活性很低，但成虫能飞行，活性非常高。烟蓟马（*T. tabaci*）通过锉吸方式取食寄主植物表皮以下细胞内的物质。成虫能生活大约 20 天，一年可繁殖多代。

表 11.5　蓟马传病毒的传播

蓟马种类	病毒	病毒科（组）	病毒与介体的关系
苜蓿蓟马（*Frankiniella occidentalis*）	花生环斑病毒（GRSV）[a]	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
	凤仙花坏死斑病毒（INSV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
	李矮缩病毒（PDV）	等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）	花粉传
	天竺葵花碎锦病毒（PFBV）	香石竹斑驳病毒属（*Carmovirus*）	花粉传
	李环斑坏死病毒（PNRSV）	等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）	花粉传
	烟草曲茎病毒（TCSV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
	番茄斑萎病毒（TSWV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
烟草褐蓟马（*F. fusca*）	番茄斑萎病毒（TSWV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
丽花蓟马（*F. intonsa*）	花生环斑病毒（GRSV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
	烟草曲茎病毒（TCSV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
	番茄斑萎病毒（TSWV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP

续表

蓟马种类	病毒	病毒科（组）	病毒与介体的关系
棉花蓟马（*F. schulzei*）	花生环斑病毒（GRSV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
	烟草曲茎病毒（TCSV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
	番茄斑萎病毒（TSWV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
菊小头蓟马（*Microcephalothrips abdominalis*）	李环斑坏死病毒（PNRSV）	等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）	花粉传
	烟草线条病毒（TSV）	等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）	花粉传
南黄蓟马（*Thrips australis*）	李属环斑坏死病毒（PNRSV）	等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）	花粉传
T. imaginis	李属环斑坏死病毒（PNRSV）	等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）	花粉传
棕榈（节瓜）蓟马（*T. palmi*）	花生芽坏死病毒（GBNV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
	小麦线条花叶病毒（WSMV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
粗毛蓟马（*T. setosus*）	番茄斑萎病毒（TSWV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP
烟蓟马（*T. tabaci*）	李属环斑坏死病毒（PNRSV）	等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）	花粉传
	藜草花叶病毒（SoMV）	南方菜豆花叶病毒属（*Sobemovirus*）	花粉传
	烟草线条病毒（TSV）	等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）	花粉传
	番茄斑萎病毒（TSWV）	番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	PP

注：a. 参见附录1的病毒名称缩写。PP，持久性增殖型（persistent propagative）。承蒙惠允，引自 Ullman 等（1997）。

4个病毒科或组的病毒由蓟马传播（表 11.5），等轴不稳环斑病毒属病毒（ilarviruses）、南方菜豆花叶病毒属病毒（sobemoviruses）和香石竹斑驳病毒属病毒（carmoviruses）可由花粉传播，携带花粉的蓟马在取食过程中通过机械损伤进行接种。而番茄斑萎病毒属病毒（tospoviruses）是以持久增殖型方式传播的。

A. 蓟马的解剖结构

尽管仅对温室条蓟马（*Hercinothrips femoralis*）的解剖结构做了详尽的研究，但研究结果可以应用到蓟马科的其他成员（Nagata，1999）。蓟马的取食器官由一个上颚（mandible）和两个下颚（maxillae）组成，下颚骨在叶片上穿孔，两个下颚插入植物细胞吮吸细胞内物质（图 11.16）。口器与前肠相连，接着是中肠，中肠又分前（Mg1）、中（Mg2）、后（Mg3）3个区。前肠和后肠是外胚层（ectoderm）发育而来，由较厚的不能渗透的表皮排列组成；中肠是内胚层（endoderm）发育而来，具有柔软的内部上皮细胞层。唾腺复合物由两个裂片状（lobular）和两个管状的腺体组成，两个管状腺体可能对应于其他昆虫的附属唾腺。已有研究表明，管状腺体与 Mg1 连接（Ullman *et al.*，1989），但没能发现直接的连接（Del Bene *et al.*，1991）。Mg1 也和唾腺连接，由纤细的丝状结构组成的裂片状腺体称为韧带（ligament）（Ullman *et al.*，1989）。

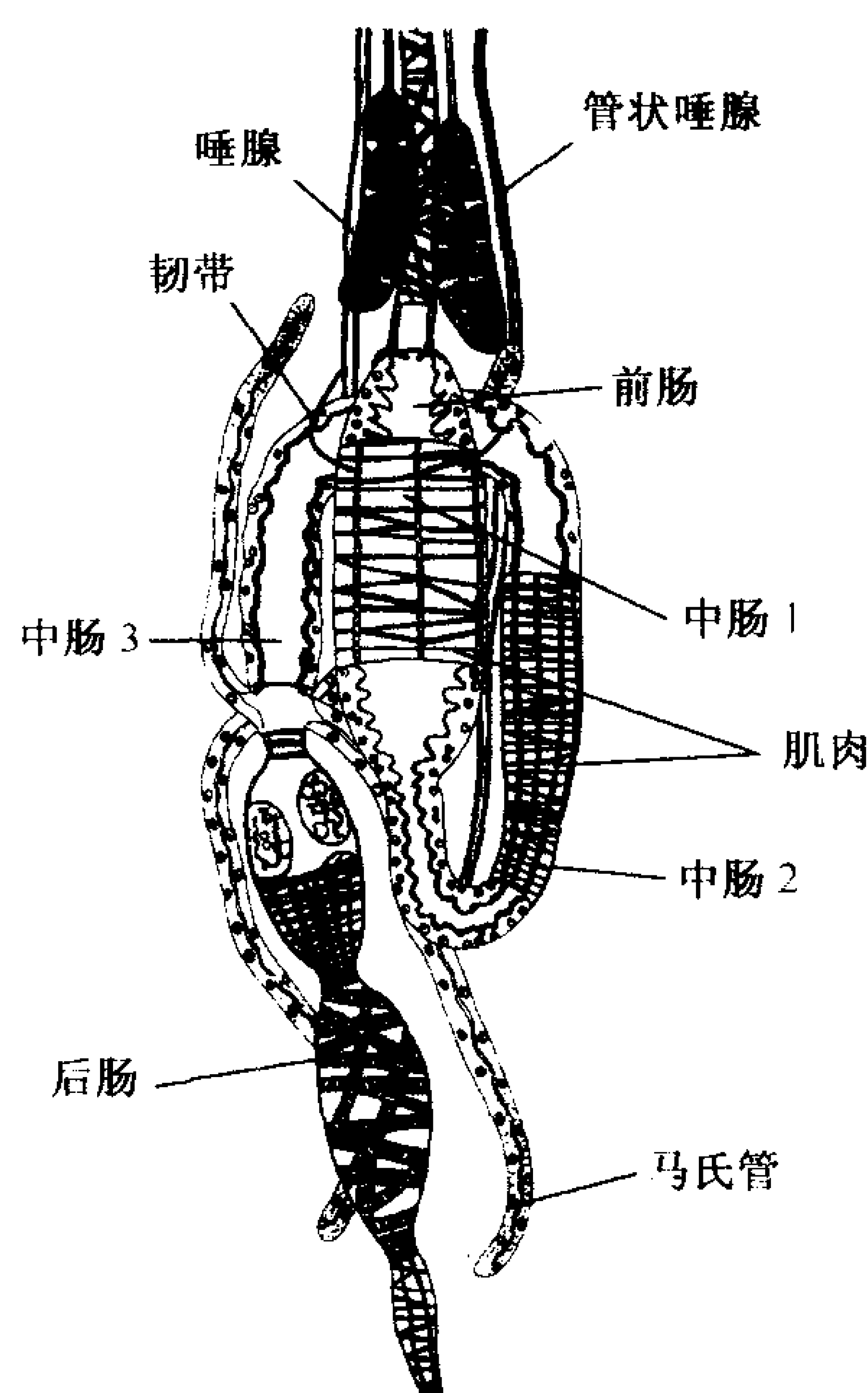


图 11.16 温室条蓟马（*H. femoralis*）的消化道及附属器官构成图。承蒙惠允，引自 Nagata（1999）。

B. 番茄斑萎病毒的传播（Nagata，1999）

蓟马对番茄斑萎病毒属病毒的传播有几个显著特点（图 11.17）。只有若虫可获毒，而成虫不能，获毒能力随虫龄的增加而降低。只有一龄若虫获毒后才能有效地传播（van Wetering *et al.*，1996）。苜蓿（西花）蓟马（*Frankliniella occidentalis*）的一龄若虫在饲毒短短 5 min 内就能获毒和传播，但取食受侵染的凤仙花属（*Impatiens*）植物时平均获毒时间为 106 min。对凤仙花属植物叶盘的平均接种时间为 58 min，潜育期受温度的影响，在 27℃和 20℃条件下平均潜育期分别为 84 h 和 171 h。获毒介体可能终生保持侵染性，但传毒的能力是不确定的，且不能将病毒传给子代。

尽管雌虫的病毒含量比雄虫高，但雄虫的传毒效率比雌虫的要高，原因可能是取食行为的不同（Sakurai *et al.*，1998；van der Wetering *et al.*，1999）。已知存在着不同水平的种和生物型（biotype）专化性（Wijkamp *et al.*，1995）。苜蓿蓟马（*F. occidentalis*）是番茄斑萎病毒属病毒中 TSWV、INSV、TCSV 和 GRSV 4 种病毒的最高效的传毒介体。苜蓿蓟马的黑暗型传播 TSWV、TCSV 和 GRSV，而光照型低效地传播 TSWV 和 TCSV。来自不同地理区域的 4 个烟蓟马群体中仅有一种能够传播供试病毒中的 TSWV，且传毒效率很低。

如果在植物中连续继代培养 TSWV，则该分离株会丧失由蓟马传播的能力。

C. 病毒与介体的关系

有人研究了苜蓿蓟马的若虫和成虫体内 TSWV 的核衣壳和非结构蛋白的积累

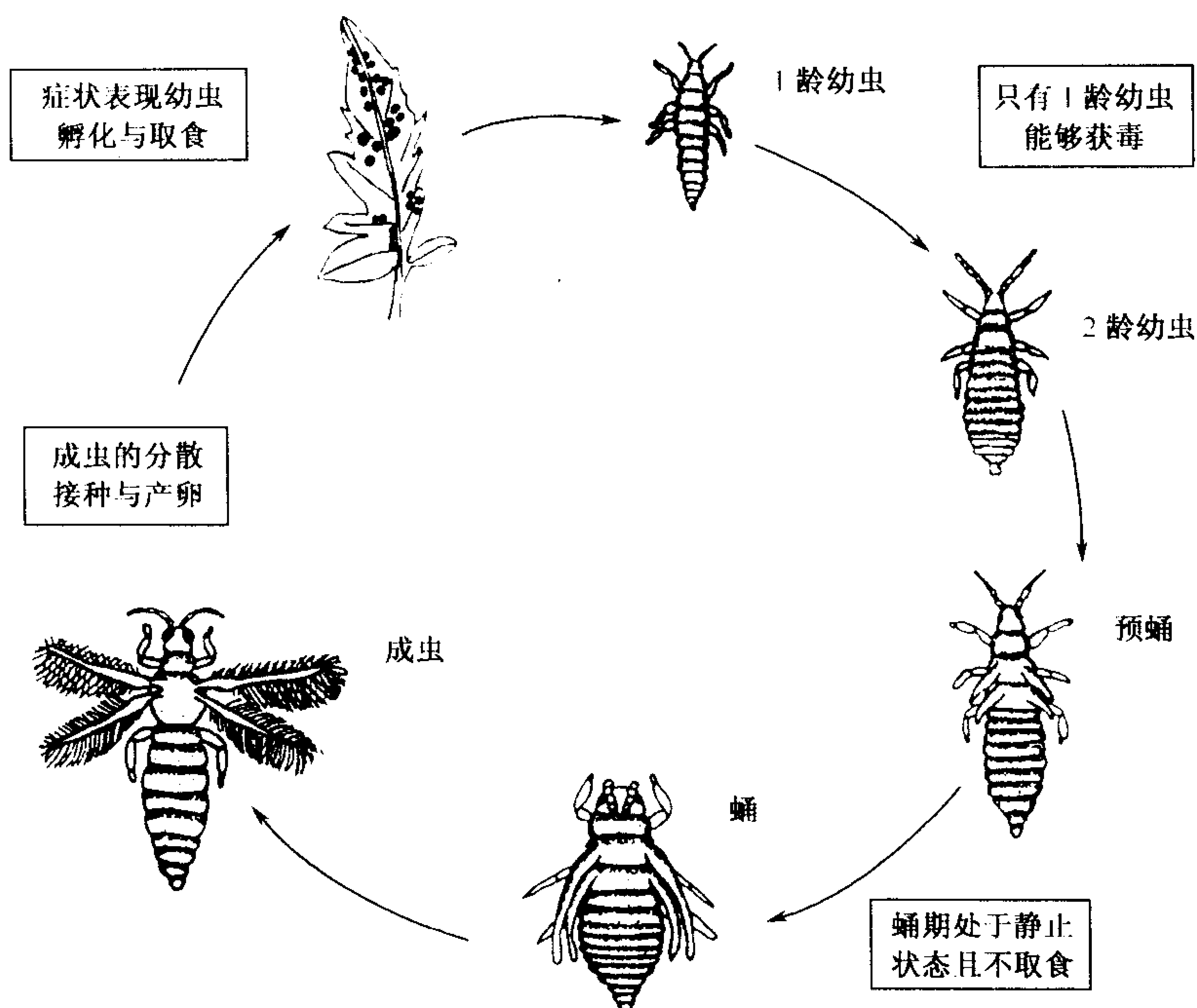


图 11.17 蓟马与番茄斑萎病毒属病毒（tospoviruses）的关系示意图。只有在幼虫期获毒的成虫才能传毒。二龄幼虫偶尔也传播番茄斑萎病毒属病毒，但因无翅而极少能广泛扩散。成虫是主要的扩散阶段，因此具有最大的流行学意义。承蒙惠允，引自 Ullman 等（1997）。

（Wijkamp *et al.*，1993），研究发现两种蛋白质的含量在介体内都有增加，病毒蛋白和病毒粒体积累在唾腺和其他组织内。通过对 TSWV 的获毒时间和潜育期的观察表明，TSWV 在介体内进行了复制。

与其他持久性传播的病毒一样，番茄斑萎病毒属病毒进入介体要利用受体介导的机制越过几重屏障。TSMV 被突起状包膜包裹，包膜由病毒编码的伸出膜外的两种糖蛋白组成（参见第 5 章第Ⅷ节 B）。用受野生型和包膜缺失病毒侵染的植株分别饲喂苜蓿蓟马，结果表明，蓟马只有获得完整的病毒粒体后才能传播（Nagata，1999）。同样，包膜缺失的病毒衍生物不能侵染苜蓿蓟马细胞，具有包膜的野生型病毒在去除包膜后也不能侵染。以上结果表明，病毒的糖蛋白含有与位于中肠的受体结合的位点，已经发现苜蓿蓟马的两种蛋白质与 TSWV 的糖蛋白结合。凝胶覆盖（gel overlay）测定和免疫标记分析鉴定了蓟马的 50 kDa 蛋白质，以及分别针对两个 TSWV 糖蛋白之一的抗独特型抗体（anti-idiotype antibody）标记了一个位于蓟马幼虫中肠的 50 kDa 蛋白质（Bandla *et al.*，1998）。在苜蓿蓟马（*F. occidentalis*）和烟蓟马（*T. tabaci*）体内发现与 TSWV 结合的 94 kDa 蛋白质，而在非介体（non-vector）桃蚜（*M. persicae*）体内则没有发现。该蛋白质与 TSWV 的 G2 糖蛋白结合，分布在蓟马的整个躯体（Kikkert *et al.*，1998）。蓟马的这两种蛋白质的结合特性可能表明它们与受体位点有关，但位点的具体细节尚未得以鉴别。

D. 病毒通过蓟马体内的途径

Nagata（1999）用免疫荧光染色法（immunofluorescent staining）对获毒后各个时期的若虫进行染色，详细研究了 TSWV 在苜蓿蓟马中的循环途径。大约在获毒 24 h 后，在中肠的 Mg1 区发现了初侵染（图 11.16）。在一段时间内这些侵染得到增强但仍然限制在 Mg1 的上皮（epithelium）内，在幼虫的后期阶段，病毒扩散到环形的和纵向的中肠肌肉组织中。临近成虫阶段时，中肠和前肠的脏肌（visceral muscle）组织受到侵染。在获毒后 72 h 初次发现对唾腺的侵染，同时，连接中肠和唾腺的韧带（ligament）也被侵染。还没有发现 TSWV 在血腔和中肠基片（basal lamina）内的证据，病毒似乎是通过连接中肠 Mg1 和唾腺的韧带进入唾腺的。这与以前提出的持久性病毒在蓟马中循环的途径不同，传统上认为持久性传播的病毒通常从肠道细胞通过血腔到达唾腺。

在二龄期摄食 TSWV 的蓟马，中肠的感染率较低，唾腺也很少受到侵染。

第Ⅶ节　其他吮吸式和刺吸式昆虫介体

A. 粉蚧（蚧总科 Coccoidea 与粉蚧总科 Pseudococcoidea）

不像其他蚜虫和叶蝉介体，粉蚧较少移动，这一特点使得粉蚧作为病毒介体的传毒效率相对低得多。粉蚧通过接触将病毒从一个植株扩散到另一株，蠕动的若虫比成虫更易于运动。照料粉蚧的蚂蚁能在植株间搬运粉蚧（Sether *et al.*，1998）。粉蚧偶尔可借助风力发生长距离扩散。粉蚧取食韧皮部。

已经发现粉蚧可作为多种病毒的介体，如杆状 DNA 病毒属（*Badnavirus*）的多个种、几种长线病毒属病毒（closteroviruses，GLRaV-3、LCV 和 PMWaV）和纤毛病毒属病毒（trichoviruses，GVA 和 GVB）。Bigger（1981）报道了可可肿枝病毒（CSSV）的 6 种不同的传播介体，但个别种内又有可传和不可传的亚种（Posnette，1950）。尼兰粉蚧（*Pseudococcus njalensis*）可在 20 min 内获得 CSSV，但粉蚧刺入叶片组织需要至少 16 min，而病毒在粉蚧体内保持不到 3 h（Posnette and Robertson，1950）。CSSV 和粉蚧的关系与蚜传非持久性病毒相似。病毒可能由粉蚧的口针或口针附近组织携带。

PMWaV 由粉红色凤梨粉蚧（*Dysmicoccus brevipes*）和灰色凤梨粉蚧（*D. neobrevipes*）传播，二龄期和三龄期幼虫比一龄期和怀孕雌虫获毒效率要高（Sether *et al.*，1998）。GLRaV-3 在橘臀纹粉蚧（*Planococcus citri*）介体中保持 24 h（Cabaleiro and Segura，1997），显示的是一种半持久性关系。

B. 蝽象类（盲蝽科 Miridae 与拟网蝽科 Piesmatidae）

盲蝽（mirid）以口针取食，但其生物学特性和分类还不是很清楚。研究表明，烟盲蝽（*Cyrtopeltis nicotianae*）是 VTMoV、SBMV 和其他一些南方菜豆花叶病毒属病毒（sobemoviruses）的介体（Gibb and Randles，1988）。最短获毒时间为 1 min，具有非持久性病毒的特征。但是，随着饲毒时间的延长传播速率也有提高，这一点是半持久性或循环型病毒的传播特征，其他的特征则与半持久性或循环型病毒相似。VTMoV 的

病毒抗原在介体烟盲蝽的肠道、血腔和粪便内都已检测到，但未在唾腺中发现，在获毒后6天的粪便内存在着有侵染力的病毒（Gibb and Randles，1990）。无传染力的盲蝽能够从存在于上表皮的侵染性汁液沉淀物接种植物，因此，针对这类病毒与介体的关系，有人提出了不涉及唾腺的摄食-排出（ingestion-defecation）模型。因此，蝽象对病毒的传播在某些方面与甲虫对病毒的传播有相似之处。由于盲蝽是重要的作物害虫，其他的病毒介体还有可能被发现。

BLCV由甜菜拟网蝽（*Piesma quadratum*）以持久性、增殖型的方式传播。还没有病毒经此类介体的卵传播的证据（Proesler，1980）。

第Ⅷ节　具咀嚼式口器的昆虫介体

A. 介体类群和取食习惯

来自直翅目（Orthoptera）和革翅目（Dermaptera）的几种介体已有报道，其中主要介体属于鞘翅目（Coleoptera）甲虫，几乎所有的此类介体仅属于少数几个科。有趣的是主要是叶甲科（Chrysomelidae），该科包括55 000个取食植物的甲虫种，其中已知约30个种传播病毒，每个种的取食范围较窄。在亚科Galerucinae和Halticinae（跳甲）中发现有20个种是病毒介体，两个来自叶甲亚科（Crysomelinae），另外两个来自负泥甲亚科（Criocerinae）。Selman（1973）指出，这些介体的分布反映了研究者的偏好而并非自然界中的实际情况，因此可能还有许多甲虫介体有待于发现。

在象甲科（Curculionidae）和梨象甲科（Apionidae）中，少数种是病毒的传播介体。

食叶甲虫不具有唾腺。叶甲（chrysomelid beetle）主要取食维管束之间的薄壁组织，因此取食后在叶片上留下孔洞，但侵害（infestation）加重时，造成的危害可能更严重。叶甲取食过程中有回吐行为，利用植物汁液浸洗口器，如果被取食的植物有病毒侵染，则其口器就会沾染带有病毒的汁液。曾经认为甲虫的传毒仅仅是携带病毒而造成创伤的机械过程。事实并非如此，因为：①一些稳定的靠汁液传播的病毒如TMV并不易被甲虫传播（Orlob，1963）；②一些病毒可能在甲虫介体内保持较长的时间；③在病毒和甲虫介体间存在很高程度的特异性，Fulton等（1987）对此做了综述。

B. 甲虫传播的病毒

由甲虫传播的病毒属于芜菁黄花叶病毒属（*Tymovirus*）、豇豆花叶病毒属（*Comovirus*）、雀麦花叶病毒属（*Bromovirus*）和南方菜豆花叶病毒属（*Sobemovirus*），这些属的病毒大多数都不能由节肢动物中的其他成员传播（但南方菜豆花叶病毒属病毒可被盲蝽传播，见第Ⅶ节B），一般都相当稳定，在侵染组织中达到较高的含量。这些病毒都是小的球状粒体（直径25～30 nm），易于机械接种传播，与其甲虫介体一样，寄主范围相对较窄。

C. 甲虫与病毒的关系

甲虫能够迅速获毒，甚至在舐咬一口后就能获毒，但取食时间越长传毒效率就越高，饲毒时间也越长（Fulton *et al.*，1987）。在特定甲虫取食被侵染植物后，一些病毒迅速出现在血淋巴内，而其他甲虫种则不能（Wang *et al.*，1992；1994）。病毒进入血腔后，昆虫成为带毒介体，饲毒时间因甲虫而异，为1～10天。然而在越冬的静止状态下，甲虫可饲毒数月，甲虫对感病植物舐咬第一口就能传毒。还没有证据表明获毒后潜育期的存在和病毒在甲虫介体内的复制。以上研究表明病毒只是在甲虫表面传播。

吐弃流质（regurgitant fluid）是决定甲虫是否可作为病毒介体的关键因子（Gergerich *et al.*，1983）。这一发现促进了总损伤（gross wounding）技术的建立，这一技术是模仿甲虫取食造成创伤的机制，用带有病毒和回吐物质混合物的玻璃柱将叶片切割成盘状。当病毒与回吐物质混合后，仅仅由甲虫传播的病毒可通过总损伤技术传播，而用常规的摩擦机械接种方法，这种混合物就没有侵染性（Gergerich *et al.*，1983；Monis *et al.*，1986）。回吐物对非甲虫传播的病毒的抑制具有可逆性，因为具有侵染性的病毒在反刍物与病毒的混合物被稀释或将病毒分离后其侵染性可得到恢复。

在食叶甲虫的回吐物中发现了RNA酶（RNase），其活性相当于0.1～1.0 mg/ml的胰腺RNase的活性。在利用总损伤技术接种时，回吐物中一定浓度的核酸酶抑制了非甲虫传播的病毒，如TMV的传播（Gergerich *et al.*，1986），但甲虫传播病毒的传播不受影响。因此，胰腺核酸酶（pancreatic RNase）能够模拟甲虫回吐物的作用。进一步的研究发现了3种切割方式不同的核酸酶，与胰腺核酸酶具有相同的识别特性。其余的碱性蛋白对非甲虫传播病毒的传播没有抑制作用，由此可见，影响病毒传播效率的因素是蛋白酶的活性（Gergerich and Scott，1988a）。其中的原因还不清楚，可能如Gergerich和Scott所述，核酸酶的活性影响了非甲虫传播的病毒在初侵染细胞中的定殖。另外，RNase可能与病毒如TMV更牢固地结合以阻止病毒在细胞中脱壳。

Gergerich和Scott（1988b）表明，几种甲虫传播的病毒能够通过茎部伤口，并且这种病毒接种到茎部被蒸汽破坏的完整植株后，依然能够移动到受侵染的植株的上部，而非甲虫传播的病毒则不能。以上结果表明，甲虫传播病毒的一个特点是具有转移到木质部（xylem）和侵染未创伤组织的能力。但是，甲虫传播的TYMV能够从叶柄切口进入叶片但不能侵染该叶片（Matthews，1970）。

当接种混合物中加入叠氮化钠（sodium azide）后，总创伤位点周围区域的细胞迅速被杀死但SBMV仍然能够侵染，而非甲虫传播病毒的传播则受到严重影响（Fulton *et al.*，1987）。这表明，甲虫传播的病毒移动到木质部的能力能够使病毒移动到未受叠氮化钠影响的细胞之中。

现在才了解看似简单的甲虫对病毒的传播实际上是一个相当复杂的过程。上述实验使我们对为何一些甲虫种对特定的病毒是高效的介体之类的专化性问题有了初步了解。

第Ⅸ节　螨类（蛛形纲）

瘿螨科（Eriophyidae）和叶螨科（Tetranychidae）的成员通过刺吸的方式取食植物，但在许多方面又有所不同。瘿螨科的几个螨类成员是黑麦草花叶病毒属（*Rymovirus*）病毒的介体。一个未归属的病毒（桃花叶病毒，*Peach mosaic virus*）是由叶螨科传播的。

A. 瘿螨科

瘿螨（eriophyid mites）与其他螨类的关系较远，已知的瘿螨成员至少传播 6 种病毒，它们取食的方式是通过口针穿刺植物细胞，并吸取细胞内容物。其两个口针保持在喙沟（rostrum groove）内，喙沟有两个起着唾液道作用的垫（pad）（图 11.18）。

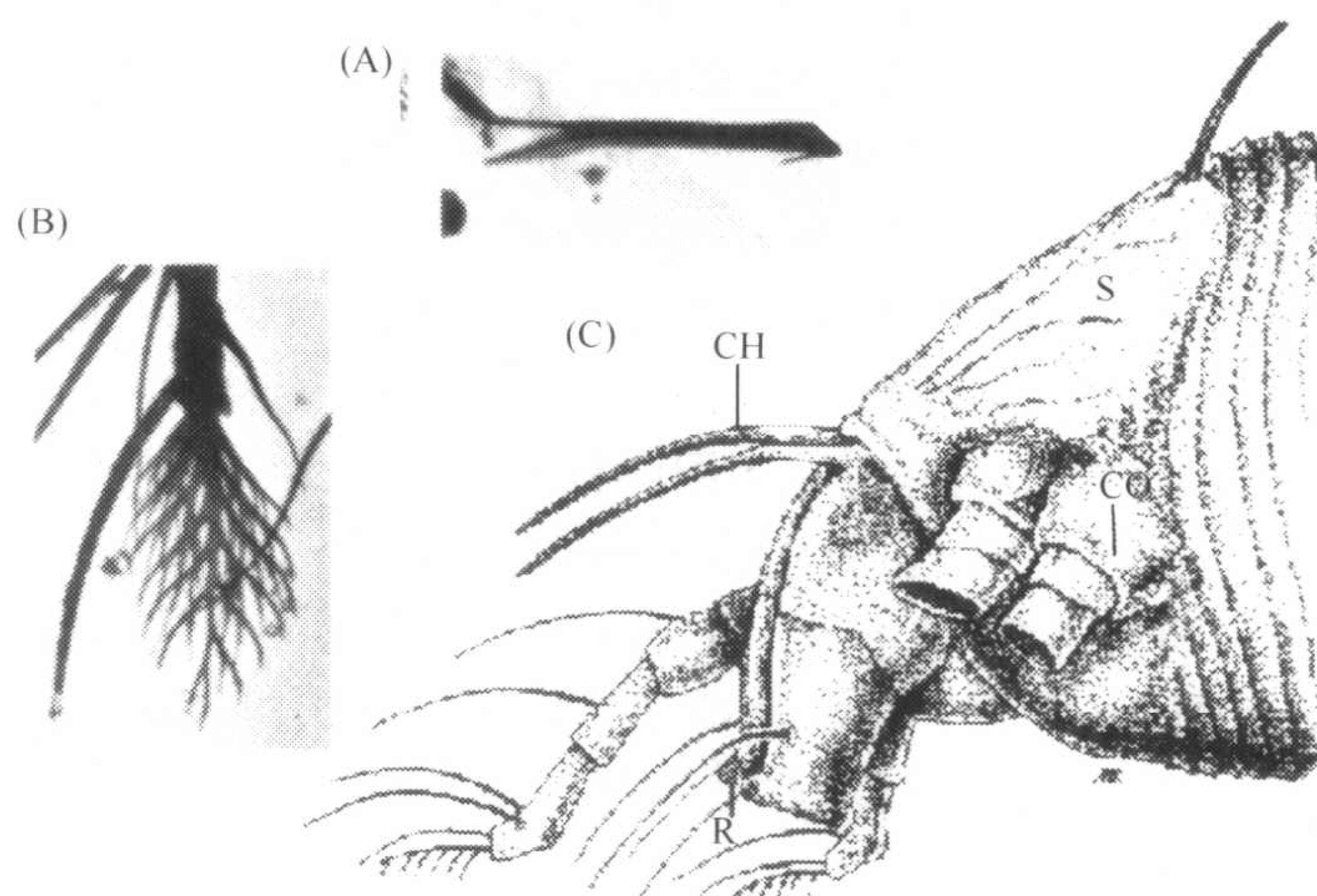


图 11.18　曲叶螨（*Aceria tulipae*）成虫的头部。S，鳞（盾）；CO，基节（coxa）；R，喙（rostrum）；CH，口针。(A) 口针的电镜图。沿口针上侧有一根毛，口针长约 5 μm，但取食时仅刺入口针长度的 1/3；(B) 羽状爪（feather claw）的电镜照片。承蒙版权所有者（Blackwell Science Ltd）惠允，引自 Orlob (1966)。

瘿螨是非常小的节肢动物（长约 0.2 mm），较难独立运动，通常聚集在花蕾和幼嫩叶片上几乎不引起伤害，因而可能受到人们的忽略。干燥条件下易于死亡。尽管如此，螨类主要靠风力在植株间传播（Slykhuis，1955）。

大多数螨类对取食的寄主植物都是特异性的，通常局限于一个属或者最多一个科内的植物。这些螨类离开寄主植物就不能长期生存，因此它们取食的对象大多是多年生的植物。其发育史相当简单，在 6～14 天即可完成，有两个若虫期接着是处于休眠状态的先蛹（pseudopupa）期。通常看不到雄虫，一些种有两种雌虫，其中一种特化为休眠态。

研究最多的螨类介体之一是曲叶螨（*Aceria tulipae*），它可以同时传播两种病毒，

小麦线条花叶病毒（WSMV）和小麦斑点花叶病毒（wheat spot mosaic virus）（Slykhuis，1962）。螨类成虫的主要内部结构如图11.19所示。

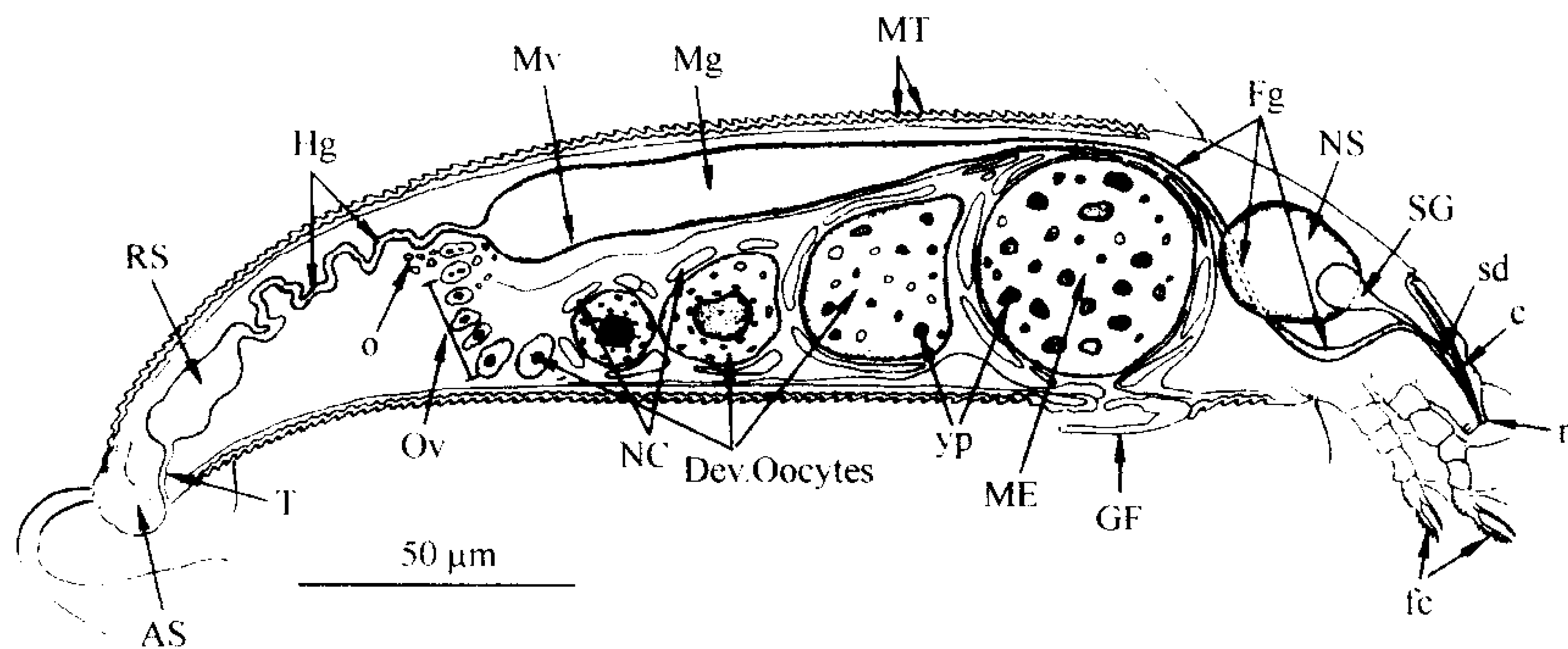


图11.19　曲叶螨（*Aceria tulipae*）雌性成虫图。fc，羽状爪；r，喙（rostrum）；sd，唾管；c，螯肢（钩角，chelicera）；SG，唾腺；NS，神经节（neurosynganglion）；Fg，前肠；GF，生殖盖（genital flap）；ME，成熟的卵；yp，卵黄小板（yolk platelet）；MT，微瘤（microtubercle）；Mg，中肠；Mv，微绒毛（microvilli）；Dev. Oocytes，发育中的卵母细胞；NC，抚育细胞（nurse cell）；o，卵巢管（ovariole）；Ov，输卵管区（oviduct region）；Hg，后肠；RS，直肠囊（rectal sac）；T，直肠管（rectal tube）；AS，肛吸盘（anal sucker）。承蒙惠允，引自 Whitmoyer 等（1972）。

该介体与病毒WSMV的关系已经研究的非常详尽。与非持久性蚜传的病毒相似，螨类传播的病毒也具有棒状粒体，并且易于通过汁液传播。曲叶螨取食受侵染叶片15 min后即可获毒，与该病毒传播所需的最短时间相近。螨类经过蜕皮后至少在温室里仍保持传染性，在离开发病植物后可保持传染能力6～9天；3℃条件下，在“对病毒免疫的”（virus-immune）寄主上生活2个月以上仍具有传染性。若虫取食受侵染植株获毒后具有传染性，但成虫不具有传染性。在单独测试的来自发病小麦植株的螨类中，约30%可传播该病毒（Slykhuis，1965；Orlob，1966）。这种未被鉴定的引起小麦斑点花叶的病毒与其介体曲叶螨有很密切的关系（Nault and Styer，1970）。

因为螨类的体形小，研究病毒与螨类介体的关系比较困难。还没有充分的证据证明病毒可在螨类介体内复制，Paliwal（1980）在郁金香瘿螨（*Eriophyes tulipae*）的中肠、体腔和唾腺中发现了WSMV病毒粒体，表明该病毒在此介体中是循环型的。

B. 叶螨科

叶螨科体形属中等大小（0.8 mm），均取食植物，寄主范围较广。二斑叶螨（*Tetranychus urticae*）曾被认为是PVY的传毒介体，但未得到Orlob（1968）的证实。Orlob的研究表明 *T. urticae* 不能传播供试的9种病毒，但能够获得几种病毒，因为在虫体中存在着那几种病毒。数种不能被传播的病毒在螨虫体内达到相当高的浓度（Orlob and Takahashi，1971）。

BaYSMV是由小麦褐螨（*Petrobia latens*）传播的（Robertson and Carroll，1988）。幼螨易于获得BaYSMV，幼螨和成虫都能有效地将病毒传播到大麦上（Smidansky and

Carroll，1996）。间接证据表明 BaYSMV 可以经卵继代传播（transovarial passage）（Robertson and Carroll，1988；Smidansky and Carroll，1996）。然而，带毒的（viruliferous）螨群集体（colony）在葫芦植株（BaYSMV 的非寄主）上保持一段时间后就失去了病毒，这与病毒与介体之间的增殖型关系是不一致的。

第Ⅹ节　传粉昆虫

RBDV（Murant *et al.*，1974）以及其他由受侵染的花粉传播的、具有靠昆虫传粉的植物寄主的病毒，可能会由传粉昆虫传播传染性的花粉。田间试验表明 BLMV 是通过觅食的蜜蜂携带的花粉传播的，通过 ELISA 检测（Childress and Ramsdell，1987），在田间被捕获的侵袭蓝莓（blueberry）树的蜜蜂携带的花粉中大约一半都含有病毒。套笼试验表明蜜蜂和被侵染的花粉都是再侵染所必需的。

如第Ⅵ节所述，通过蓟马携带的花粉，植物可受到香石竹斑驳病毒属病毒（carmoviruses）、等径不稳环斑病毒属病毒（ilarviruses）和南方菜豆花叶病毒属病毒（sobemoviruses）的侵染。

第Ⅺ节　线虫

自 Hewitt 等（1958）发现了葡萄扇叶病毒由剑线虫（*Dagger nematode*）传播以来，几种普遍存在的重要病毒都被证明是由土壤中的线虫传播的（Brown *et al.*，1995；1996b）。矛线目（Dorylaimida）、长针线虫科（Longidoridae）中的 3 个相近属，即剑线虫属（*Xiphinema*）、长针线虫属（*Longidorus*）和异长针线虫属（*Paralongidorus*）的介体线虫可传播病毒，属于三矛目（Triplonchida）毛刺线虫科（Trichodoridae）中的异毛刺线虫属（*Paratrichodorus*）和毛刺线虫属（*Trichodorus*）的线虫亦可传播病毒。3 个属的线虫都是外寄生性的（ectoparasitic），通过频繁的取食穿刺在根冠（root cap）附近的根部表皮细胞取食（图 11.20）。

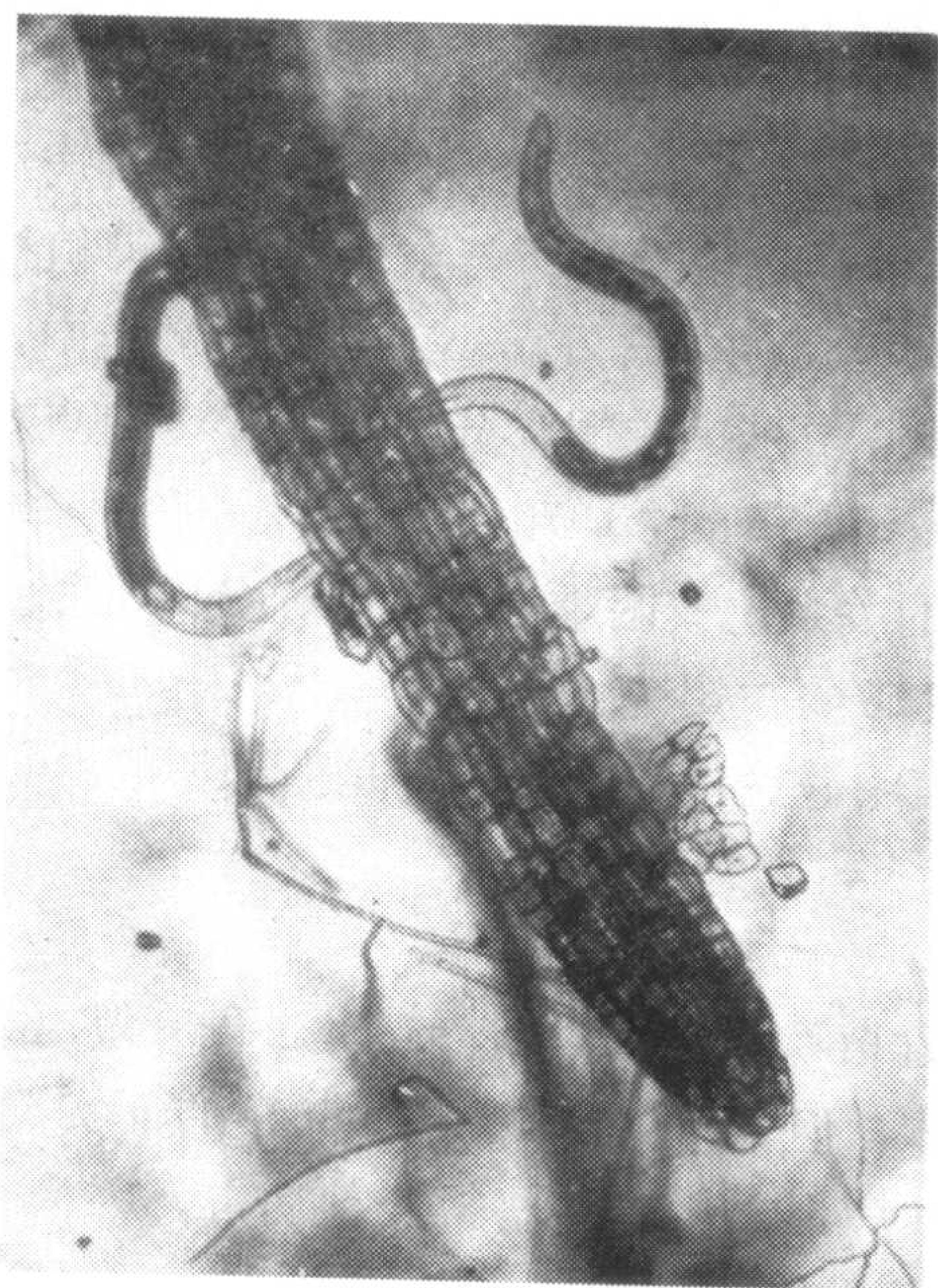


图11.20　取食蓝莓（*Vaccinium corymbosum*）根部的克氏髯根线虫（*Trichodorus christei*）。承蒙 B. M. Zuckermann 惠允。

在长针线虫科大约 375 个种中，仅有 8 个种是病毒介体，一个属于异长针线虫属，7 个属于剑线虫属。类似地，毛刺线虫科的 80 多个种中仅异毛刺线虫属的 7 种和毛刺线虫属的 4 种线虫是病毒介体。

有两个属的植物病毒是由线虫传播的，线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）

由剑线虫属和异长针线虫属的线虫传播，烟草脆裂病毒属病毒（tobraviruses）由毛刺线虫属和异毛刺线虫属的线虫传播。烟草脆裂病毒属（*Tobravirus*）的所有 3 种病毒都是由线虫传播的，但线虫传多面体病毒属仅有 1/3 的病毒由线虫传播。除 TRSV 外，这两个病毒属的病毒都是由线虫传播的，而没有其他无脊椎动物介体，一些线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）是由花粉传播的（参见第 12 章第Ⅲ节 A. 4）。

A. 线虫传毒的判定标准

由于线虫体积小，对于土壤湿度、土壤类型和很小范围的温度条件要求相当苛刻，因此研究线虫作为介体的试验比较困难。为了克服这些问题，有人提出下述 5 条标准来确定线虫是否为病毒介体（Trudgill *et al.*，1983；Brown *et al.*，1989）：

- 必须证明诱饵植物的侵染；
- 用于试验的线虫应是精心挑选的；
- 为明确线虫作为病毒介体应设置合适的对照；
- 线虫应被充分鉴定；
- 病毒的特征应充分了解。

检测线虫传毒的一般方法已经在用于测试的土壤标本中设立了适宜的诱饵寄主（如黄瓜）。这些植物在生长一段时间后，任何带毒线虫均可以取食其根部，传播病毒并进行复制，然后用诱饵植物的根部和叶片提取物机械接种适当的指示植物。也可以对这一过程做各种改进，例如，Valdez（1972）报道了测定单个线虫的简单过程，而 van Hoof（1976）表明将分离的烟草叶片埋于土壤中，数小时内就能被线虫传的 TRV 侵染。

线虫内病毒的含量测定，可以利用免疫吸附电镜技术（immunosorbent electron microscopy）测定被粉碎线虫的提取物（Roberts and Brown，1980）或者将悬浮液接种到适当的试验植物上（Yassin，1968）。毛刺线虫中的 TRV 可以利用 RT-PCR 方法检测（Van der Wilk *et al.*，1994）。值得注意的是，这些方法都只是表明线虫吸收病毒，但并不表明可传播病毒。

通过测定线虫在田间的存在来确定一种病毒的传播范围是很复杂的，可能受到各种因素的影响。例如，携带病毒的单个线虫的传播可能不同于作为整体的线虫群体对病毒的传播。某个属在土壤表层的亚群与底层土壤的亚群也不相同（Gugerli，1977），来自不同地理区域的群体的传播效率也存在着差异（Brown，1986）。

B. 线虫的取食行为

长针线虫体形较大，长 2～12 mm，细长的中空取食口针（60～250 μm）能穿透植物根尖深层。口针由前齿针（anterior odontostyle）和后舌突起（posterior odontophore）组成，前齿针能穿透根部细胞，后舌突起内有与食道相邻的神经组织。食道（esophagus）连接口针和肌唧筒（muscular pump），肌唧筒收缩食道张开产生吸力，吸出植物细胞内容物，通过单行的瓣（one-way valve）进入肠道。多数长针线虫（longidorid）在取食的第一阶段取食根尖时会诱导瘿瘤（gall）的形成，第二阶段重复分泌唾液促使细胞质液化（liquefaction）随后加以摄食。长针线虫（*Longidorus* spp.）吸收

时间较长，在这一时期，每小时可吸收大约相当于40个正常根尖细胞体积的营养物。

毛刺线虫体形更小，成虫长约1 mm。它们典型地取食根部伸长区的根毛、表皮和下表皮细胞。毛刺线虫科线虫的取食分5个阶段：探食、对细胞壁穿孔（穿刺深度为2～3 μm)、唾液分泌、摄食以及从细胞内抽出。

C. 病毒与线虫的关系

Brown和Weischer（1998）将病毒的线虫传播分成7个分离的（discrete）但相互联系的过程：摄食（ingestion)、获毒（acquisition)、吸附（absorption)、持毒（retention)、释放（release)、转移（transfer）和定殖（establishment）（Visser，2000)。摄食是从受侵染的植株中吸收病毒粒体，尽管这不需要病毒与线虫的特异性互作，但需要线虫与植物之间的特异性互作。在获毒阶段，被摄食的病毒以完整的粒体状态存在，粒体表面的专化性特征被线虫取食器上的受体位点识别，导致对病毒的吸附(图11.21)。

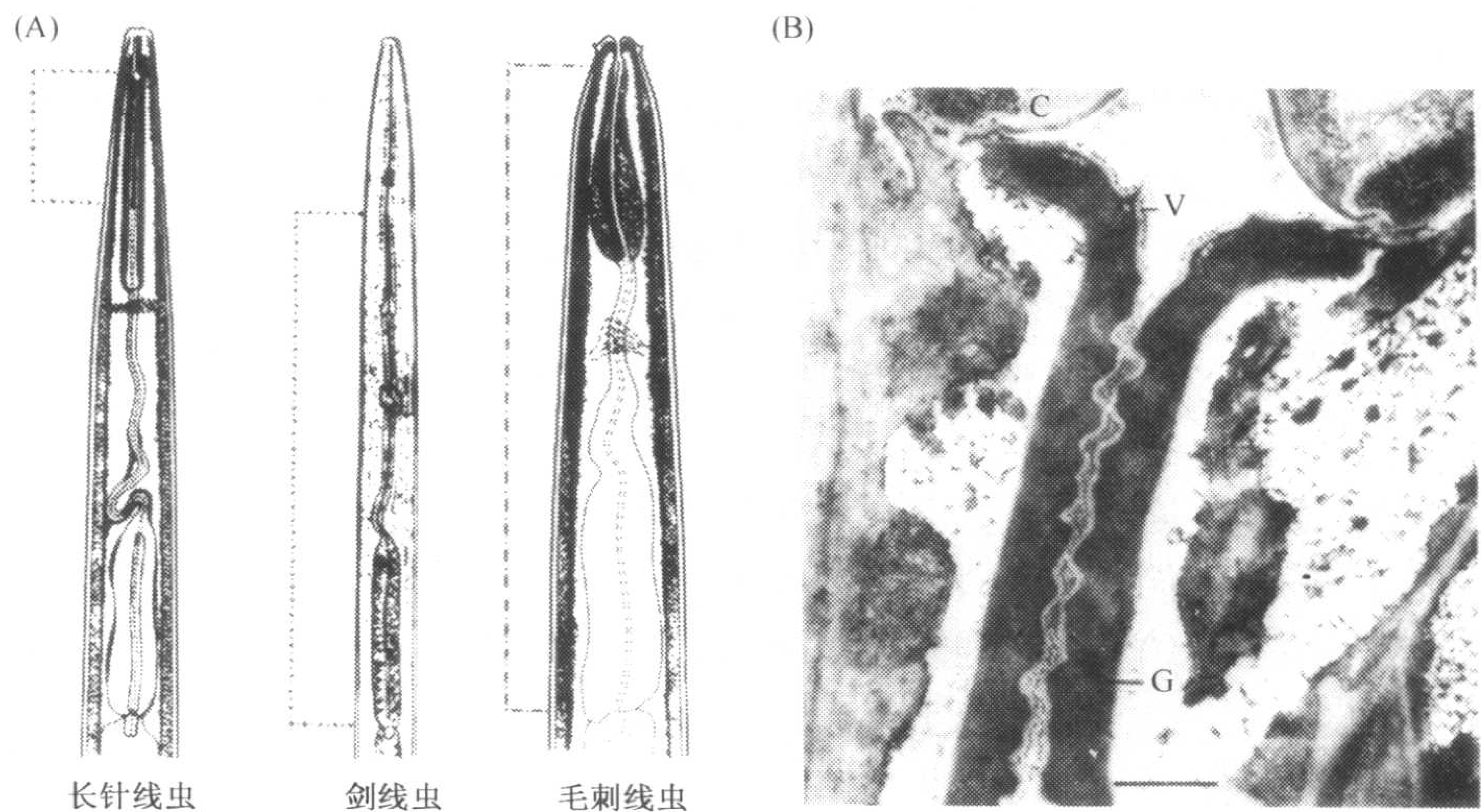


图11.21 病毒在线虫介体内的定位。(A) 线虫介体的前半部分。虚线表示保持有病毒粒体的消化道区域。(B) 携带悬钩子环斑病毒（RRSV）的逸去长针线虫（*Longidorus elongatus*）的颊区（buccal region）纵剖面图。导鞘（guide sheath，G）内有无数病毒状粒子（V），而口腔角质层（stoma cuticle，C）没有病毒粒体存在。比例尺=1 μm；承蒙惠允，引自Harrison等（1974)。

一旦被吸附，具有侵染性的病毒粒体就可以在线虫体内保持数月甚至数年，但在线虫蜕皮（moulting）后就失去侵染性。病毒粒体的释放被认为是线虫在新的植物上开始取食时由于唾液导致的pH的变化而引起的。在转移和定殖阶段，病毒粒体进入植物细胞开始复制并造成侵染。

线虫与其所传病毒的关系存在特异性，在病毒分离株和介体种之间具有明显的特异关系。几种不同的病毒分离株可以有同一线虫种作介体；相反，一种病毒分离株也可以由几种不同的线虫种传播（Brown *et al*.，1995；Vassilakos *et al*.，1997；Brown and Weischer，1998)。已知13种毛刺线虫是烟草脆裂病毒属病毒（tobraviruses）的介体，

但其中只有一个或两个种能传播烟草脆裂病毒属的所有病毒。利用来自英格兰、荷兰、苏格兰和瑞典的毛刺线虫的个体进行病毒传播测定，Ploeg 等（1992）表明，在线虫介体和烟草脆裂病毒属病毒血清类型间有高度的专化性，异毛刺线虫属（*Paratrichodorus*）种间的特异性比毛刺线虫属（*Trichodorus*）种间的专化性更加显著（表 11.6）。

表 11.6　异毛刺线虫属与毛刺线虫属线虫传播烟草脆裂病毒属病毒的互补性

病毒	血清型	已测序的分离株	介体[a]
豌豆早枯病毒（PEBV）	English	TpA56	*P. anemones*
			T. cylindricus
			T. primitivus
			T. viruliferus
豌豆早枯病毒（PEBV）	Dutch	--	*P. pachydermus*
			P. teres
烟草脆裂病毒（TRV）	PaY4	PaY4	*P. anemones*
			P. pachydermus
烟草脆裂病毒（TRV）	PRN	PpK20	*P. nanus*
			P. pachydermus
烟草脆裂病毒（TRV）	RQ	TpO1	*T. cylindricus*
			T. primitivus
			T. viruliferus

注：a. 属名：*P.*，异毛刺线虫属（*Paratrichodorus*）；*T.*，毛刺线虫属（*Trichodorus*）。
承蒙惠允，引自 Visser（2000）。

数种线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）可由多种线虫传播，但实验室和田间的试验结果有所不同。实验室条件下，RRSV 的苏格兰分离株和英格兰分离株都能分别被逸去长针线虫（*Longidorus elongatus*）和大体长针线虫（*L. macrosoma*）传播。但田间试验的结果是，苏格兰分离株仅被逸去长针线虫传播而苏格兰分离株仅被大体长针线虫传播（Brown *et al.*，1995）。

一旦获毒，病毒可能在长针线虫介体内保持 12 周，在剑线虫内保持一年，在毛刺线虫内保持一年以上（van Hoof，1970）。在线虫的传毒过程中病毒似乎在体内不进行复制，尚未在线虫细胞内观察到病毒粒体的存在。与此相一致，也没有病毒通过线虫介体的卵传播的证据。

线虫对传播病毒的专化性似乎与摄取病毒的能力无关，因为在同一线虫种内都检测到可传病毒和不可传病毒的存在（Harrison *et al.*，1974b）。通过对超薄切片的电镜观察，鉴定出病毒在线虫体内的存在位点（Brown *et al.*，1995）。线虫传多面体病毒属病毒的粒体结合在长针线虫的内表面，而与剑线虫的舌突起和食道的表皮内侧结合。烟草脆裂病毒属病毒吸附在食道内腔的表皮内侧。

D. 病毒与线虫的分子互作

i. 线虫传多面体病毒属病毒

RRSV 和 TBRV 传播效率的遗传决定因子是由 RNA 2 编码的病毒外壳蛋白

(Brown *et al.*, 1996)。已发现 ArMV 粒体与裂尾剑线虫（*X. diversicaudatum*）食道壁上的糖类物质结合（Robertson and Henry，1986）。

ii. 烟草脆裂病毒属病毒

Ploeg 等（1993）对 TRV 的线虫可传和不可传分离株的互补重组体的研究发现，传播效率与 RNA 2 无关。如第 6 章第Ⅷ节 H. 2. a 所述，烟草脆裂病毒属病毒 RNA 2 的大小是可变的，除编码外壳蛋白外，还编码 1～3 个非结构蛋白。线虫不可传的 PEBV 分离株的外壳蛋白基因被线虫可传的 TRV 的外壳蛋白基因取代后获得的重组体不能被线虫传播，这一结果表明 RNA 2 上不止一个基因参与病毒的传播（MacFarlane *et al.*，1995）。PEBV 的两个 29 kDa 和 23 kDa 非结构蛋白基因的突变与去除外壳蛋白 C 端的可动区结果一样，导致线虫传毒能力的丧失，但不影响病毒粒体的形成（MacFarlane *et al.*，1996）。然而，TRV 分离株 PpK20 仅 40 kDa 非结构基因的突变就使得厚皮异毛刺线虫（*Paratrichodorus pachydermis*）的传播能力丧失，而 32.8 kDa 基因的突变则不能（Hernández *et al.*，1997），这表明 32.8 kDa 蛋白质可能参与其他线虫种对 TRV 的传播。用酵母双杂交系统（yeast-two hybrid system）检测到 TRV-PpK20 的外壳蛋白与 32.8 kDa 和 40 kDa 蛋白质都有互作（Visser and Bol，1999）。外壳蛋白 C 端 19 个氨基酸的缺失干扰了 CP-40K 的互作，但不影响 CP-32.8K 的互作，而 C 端 79 个氨基酸的缺失对两种互作都有影响。表明这些非结构蛋白可能类似于蚜虫和叶蝉传播系统中与传毒相关的辅助组分（Visser，2000）。

第Ⅻ节　真菌

已有研究表明几种病毒是由土壤习居真菌传播的（Campbell，1996）。已知的介体是黏菌门（Myxomycota）根肿菌纲（Plasmodiophoromycetes）中的成员，或者是真菌门（Eumycota）壶菌纲（Chytridiomycetes）中的成员。两个纲的真菌都是高等植物的体内寄生菌。油壶菌属（*Olpidium*）传播球状病毒，根肿菌纲的两个属——多黏菌属（*Polymyxa*）与粉痂菌属（*Spongospora*）传播棒状或线状病毒（表 11.7）。

表 11.7　已证实或提出的有真菌介体的病毒和类似病毒的分子病原

病毒属或组	病毒种类	真菌介体[a]					
		Obr	Obo	Pgr	Pbe	Sss	Ssn
多面体病毒粒体，体外获毒							
番茄丛矮病毒属（*Tombusvirus*）	黄瓜坏死病毒（CNV）		+u				
香石竹斑驳病毒属（*Carmovirus*）	甜瓜坏死斑病毒（MNSV）		+u				
	黄瓜叶斑病毒（CLSV）		+u				
	黄瓜土传病毒（CSBV）		+u				
	SqNV		+u				
坏死病毒属（*Necrovirus*）	烟草坏死病毒（TNV）	+u					
	藜坏死病毒（ChNV）	+					
	草原龙胆坏死病毒（LNV）	+					

续表

病毒属或组	病毒种类	真菌介体[a]					
		Obr	Obo	Pgr	Pbe	Sss	Ssn
石竹病毒属（*Dianthovirus*）	红三叶草坏死花叶病毒（RCNMV）		+				
卫星病毒	STNV	+u					
多面体病毒粒体，获毒方式未知	水田芥黄斑病毒（WYSV）						+
病毒粒体未确定，获毒方式未知	WCLA						+
病毒粒体杆状，体内获毒							
真菌传杆状病毒属（*Furovirus*）	土传小麦花叶病毒（SBWMV）			+			
	OGSV			+			
	水稻条纹坏死病毒（RSNV）			+			
花生丛簇病毒属（*Pecluvirus*）	花生丛簇病毒（PCV）			+			
	印度花生丛簇病毒（IPCV）			+			
甜菜坏死黄脉病毒属（*Benyvirus*）	甜菜坏死黄脉病毒（BNYVV）				+u		
	甜菜土传花叶病毒（BSBV）				+		
马铃薯帚顶病毒属（*Pomovirus*）	马铃薯帚顶病毒（PMTV）					+	
大麦黄花叶病毒属（*Bymovirus*）	大麦轻型花叶病毒（BaMMV）			+u			
	大麦黄花叶病毒（BaYMV）			+			
	燕麦花叶病毒（OMV）			+			
	水稻坏死花叶病毒（RNMV）			+			
	小麦梭条花叶病毒（WSSMV）			+u			
巨脉病毒属（*Varicosavirus*）	莴苣巨脉病毒（LBVV）	+u					
	烟草线条病毒（TSV）	+					
	香雪兰叶坏死病毒（FLNV）	+					
其他杆状、未鉴定的病原，体内获毒	LRNA	+u					
	PYVA	+u					

注：a. 介体：Obr＝*Olpidium brassicae*；Obo＝*O. bornavanus*；Pgr＝*Polymyxa graminis*；Pbe＝*P. betae*；Sss＝*Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*；Ssn＝*S. subterranea* f. sp. *nasturtii*。

＋—与病毒传播相关的特异性真菌；＋u—非真菌和真菌类似物，与病毒的传播无特异性关系；WCLA＝watercress chlorotic leafspot agent（水田芥褪绿叶斑病原）；LRNA＝lettuce ring necrosis agent（莴苣环状坏死病原）；PYVA＝pepper yellow vein agent（辣椒黄脉病原）。

承蒙版权所有者（© Annual Reviews，www. AnnualReviews. org）惠允，引自 Campbell（1996）。

两种壶菌　芸薹油壶菌（*Olpidium brassicae*）和 *O. bornavanus* 的特点是具有后生单鞭毛的游动孢子（posteriorly uniflagellate zoospore），而另外 3 种根肿菌，禾谷多黏菌（*Polymyxa graminis*）、甜菜多黏菌（*P. betae*）和马铃薯粉痂菌（*Spongospora subterranean*）的游动孢子均具有双鞭毛。以上 5 个种都是植物根部的专性寄生物，有着相似的发育阶段（图 11.22）。

传毒真菌以休眠孢子（resting spore）的方式在作物上寄生，产生游动孢子侵染作物。游动孢子在寄主细胞质内形成菌体（thallus）。在侵染的早期阶段，菌体的细胞质

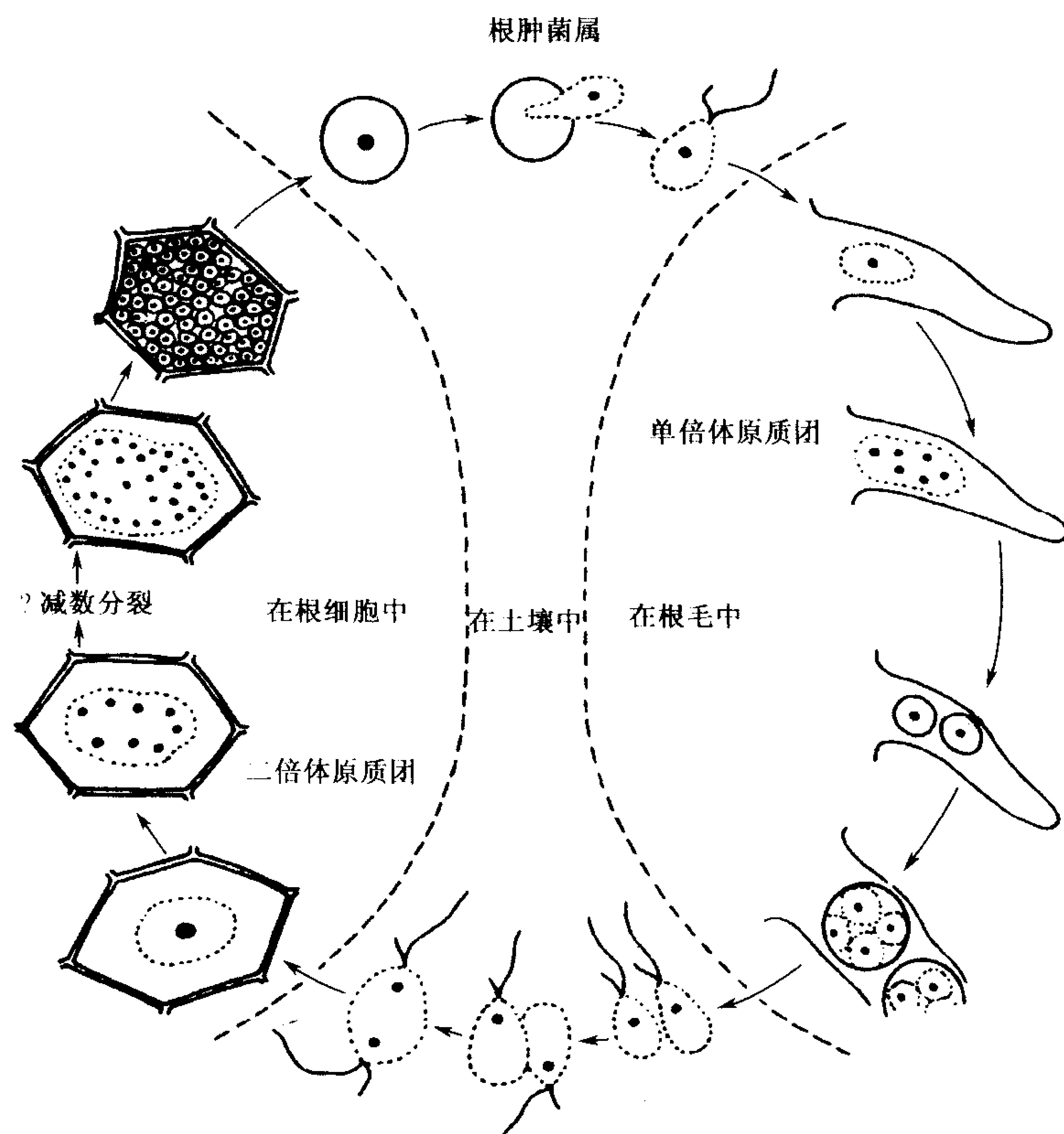


图 11.22 一种根肿菌（*plasmodiophoral* fungus）的生活史。左边展现的是在根细胞中的二倍体阶段；右边是在根毛中的单倍体阶段。中间为土壤中病毒能够在植株之间传播的阶段。

与寄主细胞质被细胞膜隔开，但侵染后期，菌体形成细胞壁，整个菌体成为无性孢子或休眠孢子。Barr 和 Asher（1996）对甜菜多黏菌侵染甜菜根系的情况进行了详细的研究（图 11.23）。图 11.24 说明了油壶菌对根部细胞的入侵。

A. 真菌的体外传播

病毒与真菌的体外（*in vitro*）关系是在番茄丛矮病毒科（*Tombusviridae*）的球状病毒与油壶菌属（*Olpidium*）的两个种之间发现的（表 11.7）。来自土壤液体的病毒粒体吸附到游动孢子膜的表面，当鞭毛被卷起时病毒进入游动孢子的细胞质内。病毒是怎样从游动孢子细胞质进入到寄主的细胞质还不清楚，但是有人认为这一过程发生在真菌侵染根系的早期阶段。TBSV（不能被 *O. bornavanus* 传播）和 CNV（能够被油壶菌传播）的外壳蛋白的相互交换试验表明，外壳蛋白参与游动孢子对病毒的吸收（McLean *et al.*，1994）。对传播效率有重要影响的 CNV 外壳蛋白中的一个氨基酸已被鉴定出来，结合（binding）研究表明这一氨基酸与油壶菌游动孢子对病毒的识别有关（Robbins *et al.*，1997）。

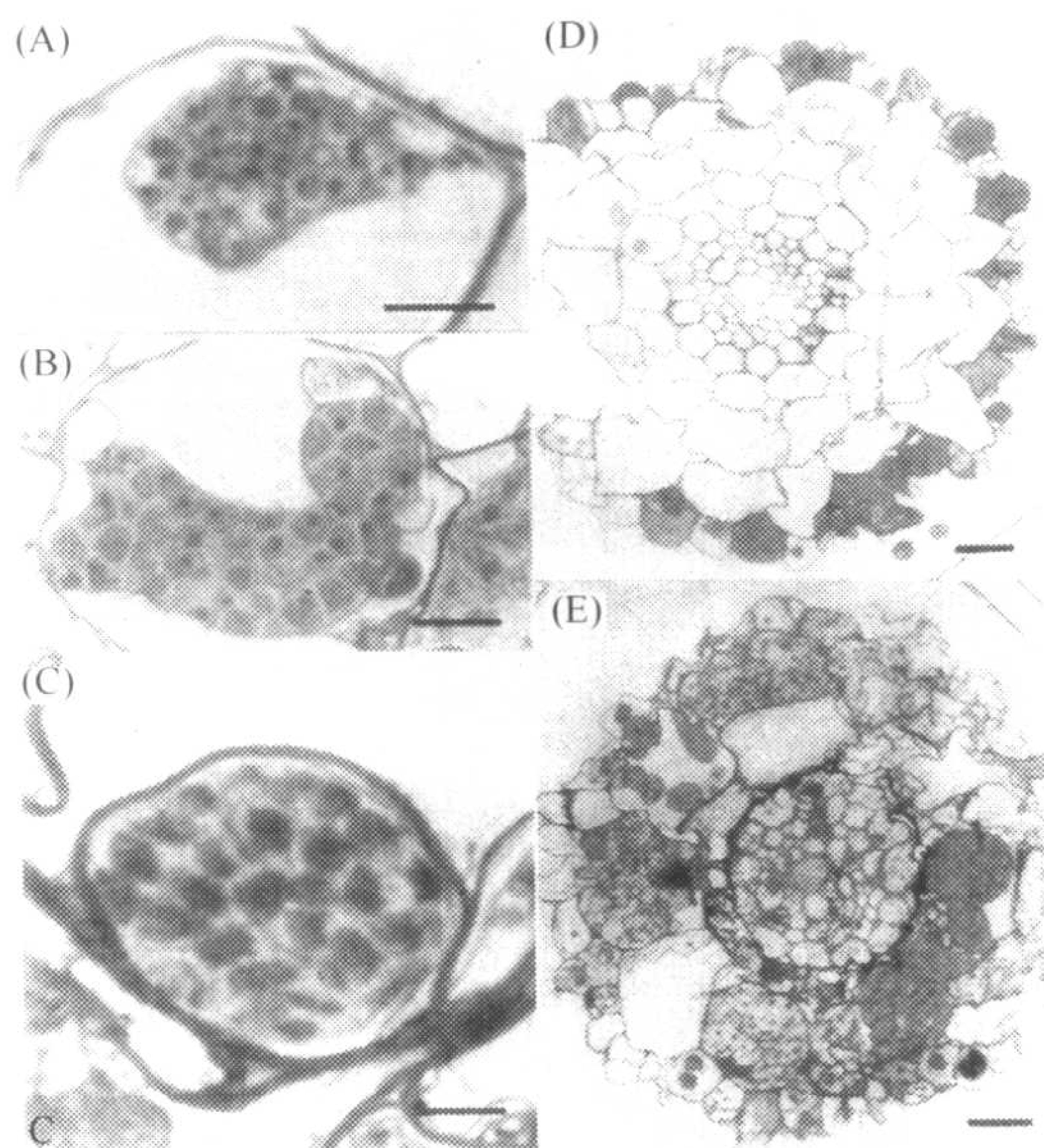


图11.23 （见彩色图版11.2）甜菜多黏菌（*P. betae*）对甜菜根部的侵染。（A）上皮细胞内的幼原质团（plasmodium），蓝色为脂质和细胞核，粉红斑点为未确定的物质；（B）皮层细胞内新生的叶状游动孢子囊（lobed zoosporangium）。注意粉红色背景、蓝色孢子以及深蓝色的细胞核；（C）含有染成蓝色的游动孢子的成熟游动孢子囊；（D）接种8天后 *P. betae* 的分布。各个发育阶段的原质团局限于表皮细胞内；（E）接种18天后 *P. betae* 的分布。原质团和游动孢子囊充满整个根皮层，但在内皮层（endodermis）或中柱（stele）中没有。比例尺：（A）和（C），5 μm；（B），10 μm；（D）和（E），50 μm。承蒙惠允，引自 Barr 和 Asher（1996）。

B. 真菌的体内传播

在大麦黄花叶病毒属（*Bymovirus*）、真菌传杆状病毒属（*Furovirus*）和巨脉病毒属（*Varicosavirus*）的棒状病毒与芸薹油壶菌（*O. brassicae*）和 3 种根肿菌之间存在着病毒与真菌的体内（*in vivo*）关系。这种关系的模式是基于对 *O. brassicae* 和LBVV、*P. graminis* 和 SBWMV 以及 *P. betae* 和 BNYVV 之间关系的观测（Campbell，1996）。当游动孢子从无性孢子囊（vegetative sporangia）或休眠孢子中释放时，病毒存在于游动孢子内，当这些游动孢子建立对植物根系的侵染时，病毒亦侵染新的寄主。游动孢子获毒和释放病毒的过程尚不清楚。对各种大麦黄花叶病毒属病毒（bymoviruses）和甜菜坏死黄脉病毒属病毒（benyviruses）的研究表明，外壳蛋白的通读域（有关 bymoviruses 和 benyviruses 的基因组组构，分别参见第 6 章第Ⅷ节 C. 2 与 H. 13 部分）可能与病毒的真菌传播有关（Campbell，1996）。BNYVV 的 RNA 3 和 RNA 4 也对病毒的传播起间接的作用，很可能是通过控制病毒在根系内的扩散和积累这样的控制因子而实现的。

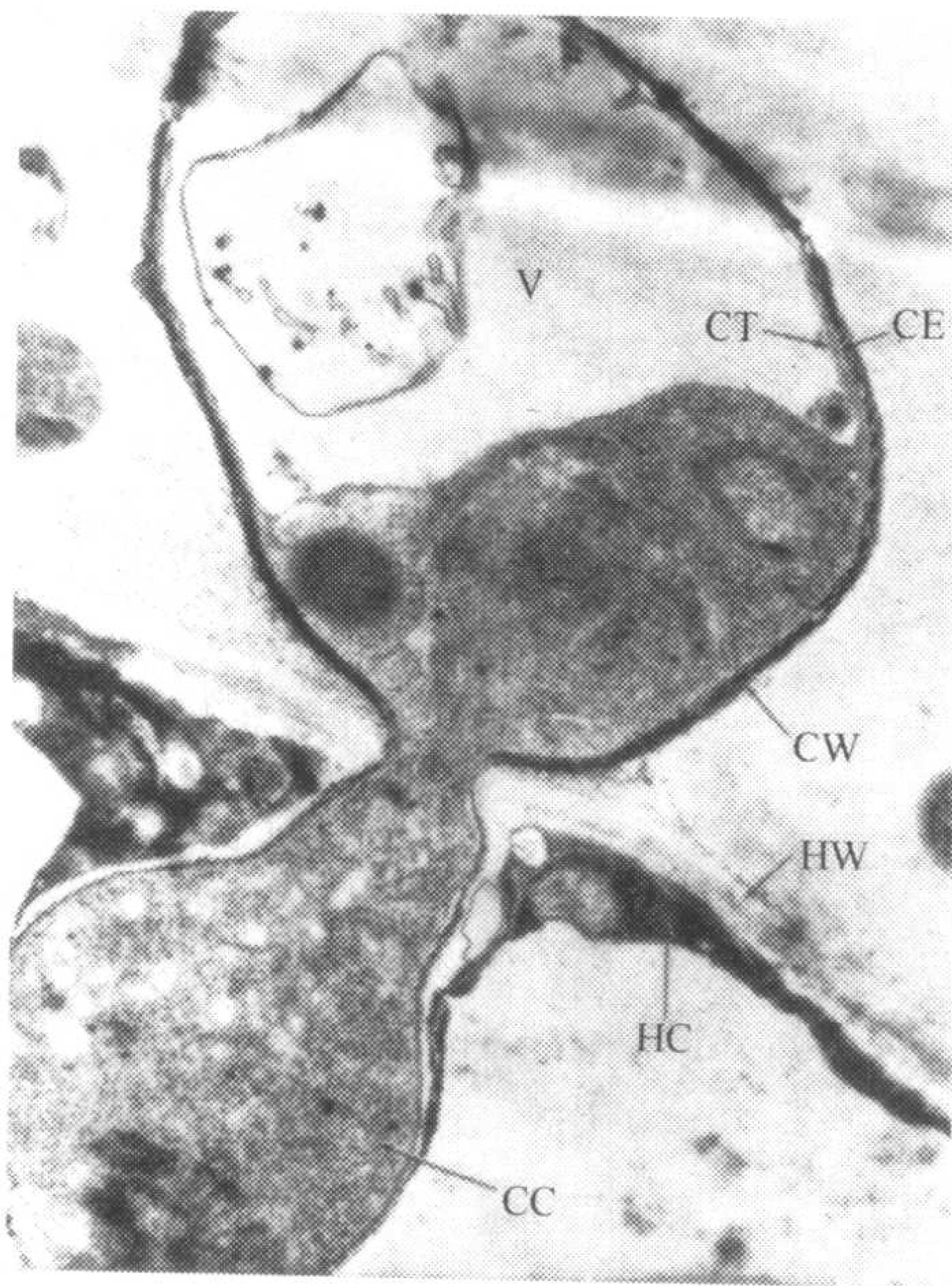


图11.24 真菌传播。油壶菌(*Olpidium*)对根细胞的侵染。电子显微照片显示的是静止子(encysted zoospore)进入寄主细胞的情况。CC，孢囊细胞质；HC，寄主细胞质；HW，寄主细胞壁；CW，孢囊壁；CT，孢囊液泡形成体(cyst tonoplast)；CE，孢囊外质体(cyst ectoplast)；V，液泡。承蒙惠允，引自 Temminck 和 Campbell (1969b)。

第Ⅷ节 讨论与结论

研究传播病毒的无脊椎动物介体的重要性有两点。第一，这些介体对于世界范围内重要经济作物病毒病害的传播起着主要的作用。第二，病毒与介体的关系具有生物学上的重要意义，尤其是有些病毒在动物介体和寄主植物中均可复制。仅有两个无脊椎动物门（线虫门和节肢动物门）中的成员取食新鲜的绿色陆地植物，其中一些成员为植物病毒的介体。

3 个线虫属含有病毒介体。剑线虫属（*Xiphinema*）和长针线虫属（*Longidorus*）是线虫传多面体病毒属（*Nepovirus*）病毒的介体；棒状的烟草脆裂病毒属病毒(tobraviruses) 由毛刺线虫属（*Trichodorus*）的线虫传播。病毒与线虫的关系有很强的专化性，几乎可以肯定涉及病毒粒体与线虫肠道的表皮内侧特异区的结合。

在节肢动物门中，有两个纲（蛛形纲和昆虫纲）的成员取食新鲜的绿色陆生植物，其中部分为病毒的介体。最重要的病毒介体为同翅目昆虫，包括蚜虫、叶蝉、粉虱和粉蚧。由于这些介体具有吮吸式口器，能穿透叶片细胞和组织，因此适宜于将病毒从发病植株传播到健康植株上。

节肢动物传播的病毒中大约 66%是由蚜虫传播的，病毒与蚜虫的关系有多种类型，总结于表 11.2。这些都不涉及“飞针”（flying pin）式传播。弹状病毒科（*Rhabdovi-*

ridae）的几个成员在蚜虫介体内复制，因此介体终生可能都具有传染性。即使蚜虫保持侵染性的时间很短暂，病毒与介体的关系也具有专化性。这些专化性涉及病毒编码的蛋白质：①辅助因子：potyviruses 和 caulimoviruses 都产生病毒编码的蚜传所必需的蛋白质。②辅助病毒：一些非持久性病毒当 RNA 被自身编码的外壳蛋白包被时不能被蚜虫传播，但是当病毒 RNA 被与其同时侵染植物的不相关病毒的外壳蛋白包被时，就能够被传播。③病毒外壳蛋白也参与特定蚜虫对特定病毒的特异性持毒能力。④蚜虫介体传播的专化性可能涉及同一病毒的不同株系，如黄症病毒科病毒。只有其基因组 RNA 被包裹于对某特定介体适宜的蛋白质外壳中的那些病毒株系才会被该介体传播。我们对参与病毒与介体互作的有关病毒方面的一些辅助组分和外壳蛋白体系的细节在分子水平上已经有所了解，但对介体方面所知甚少。

叶蝉和飞虱在介体中的重要性居第二位。叶蝉传播的病毒都不是以非持久性方式传播的，两种重要的病毒 MCDV 和 RTSV 以半持久性方式传播，或者是非增殖型的，或者是增殖型的，但多数是循环型的。叶蝉传播的病毒虽然数目不如蚜虫传播的病毒多，但包括许多经济上非常重要的病毒，尤其是侵染禾本科的粮食作物的病毒。在病毒和叶蝉间存在很强的专化性，通常两者的寄主范围都很窄。

Reoviridae、*Rhabdoviridae*、*Tenuivirus*（纤细病毒属）和 *Marafivirus*（玉米细线条病毒属）4 个科属中有的成员在叶蝉介体内复制，复制对叶蝉的影响通常很小。然而，就病毒而言，在介体内的复制有着重要的作用：①介体一旦获毒就终生具有侵染性；②病毒在介体内的复制通常与病毒的继代传播有关，这样就可为病毒提供脱离寄主植物而生存的越冬方式。在植物呼肠病毒中，特异的基因组片段编码在昆虫介体内复制所需的基因产物，在寄主植物中则不需要。在介体内复制的病毒，可能在介体与病毒或病毒株系间存在高度的专化性。

食叶的甲虫具有咀嚼式口器，但没有唾腺。取食时有回吐过程，口器在叶片汁液中浸洗，如果取食被侵染过的植物，回吐物中就会含有病毒。甲虫在舐咬一口后就能获毒，再舐咬一口健康植株就能侵染。但是，甲虫的传毒不是单纯的机械过程，在甲虫介体和病毒间存在高度的特异性，一些非常稳定的病毒，如 TMV 不能由甲虫传播。甲虫传播的病毒属于芜菁黄花叶病毒属（*Tymovirus*）、豇豆花叶病毒属（*Comovirus*）、雀麦花叶病毒属（*Bromovirus*）和南方菜豆花叶病毒属（*Sobemovirus*）的病毒。

有时一种甲虫高效传播某一特定病毒，而对相关种的病毒传播效率却很低，造成这种特异性的原因还不清楚。但是，我们已经知道一些稳定的病毒不能被甲虫传播的原因，反刍流质种含有抑制非甲虫传播病毒的抑制子，这种抑制子对甲虫传播的病毒却没有影响。有充分的证据证明这种抑制子是一种 RNA 酶（RNase）。

已经发现的其他传毒介体有粉蚧、粉虱、盲蝽和跳甲。由这些介体传播的病毒为数不多。但由前两个介体传播的病毒对热带作物造成重要病害。在蛛形纲中瘿螨（*eriophyid mites*）是几种病毒的传播介体。

对于通过花粉传播的病毒，传粉昆虫能将被侵染的花粉转移到健康植株上，因此以间接的方式传播病毒。

包括真菌在内的其他生物介体与病毒有着特异性的互作，参与这种形式传播的分子间的详细互作还知之甚少。

对生物介体而言，对参与病毒介体间特异性互作的病毒决定子的分析已经有了详尽的信息。病毒基因组相对较小和易于操作，因此分析起来也相对容易。而介体的基因组和分子生物学特征要复杂得多，因此研究的较少。现代生物技术的应用应该能够使这方面的研究成为可能，研究取得的结果将从干扰病毒与介体的互作方面着手，导致针对作物重要病毒的新防治方法的产生。

第12章 传播（传染）方式Ⅱ：病毒的机械、种子和花粉传播与流行学

前一章描述了病毒是如何通过“生物”介体，如昆虫、线虫和真菌等进行传播的。本章将介绍病毒在植物间传播的其他3个方面。由于病毒侵入寄主需要机械损伤，机械接种是在实验中侵染植物时广泛运用的一项技术；有些病毒的自然传播也是通过机械方式。在本章中，将讨论实验性病毒机械接种的多个方面，还有不涉及生物介体的其他方式（种子和花粉传播），借此病毒能够从初侵染的植株中迁移出去。最后将描述病毒如何在田间移动以及与流行相关的多种因素。

第Ⅰ节 机械传播

机械接种就是将侵染性病毒或病毒RNA通过在植物表面制造的微伤口导入植株。当病毒在细胞中定殖时，即发生了侵染。这种传播方式对于植物病毒学实验的许多方面都是非常重要的，尤其是通过局部斑的产生分析病毒（第15章）、为了提纯而使病毒增殖（第4章）以及对病毒与感病性（susceptible）细胞的互作方面的研究（第10章）。当病毒被用作接种体时，核酸必须部分或全部释放出来。这个过程已在第7章第Ⅱ节讨论过。

Walkey（1991）以及Dijkstra和de Jager（1999）详细描述了为有效地进行实验性病毒机械接种必须考虑的多种因素，这些因素包括下述几个方面。

A. 接种体的准备

用于病毒机械接种的最普通材料是被侵染的叶片组织。由于病毒必须从受侵染的植物细胞中释放出来，获得高质量接种体的许多注意事项与从植物中提纯病毒是相似的（第4章）。通常情况下，看来很可能含有大量病毒的材料被用于接种，但我们还必须考虑病毒侵染的可能抑制剂。在大多数情况下，接种幼嫩的叶片能够表现出明显的症状，但对于某些病毒而言，其他的组织可能更合适。例如，被TNV侵染的植物的根部（而不是叶部）含有大量病毒（Smith，1937）。CMV由花瓣传播的效率比叶片更高，因为叶片中含有大量的抑制剂（Sill and Walker，1952）。

发病的植物材料有时在自来水中研磨（Dijkstra and de Jager，1999），但更多的是使用提取缓冲液。多年以来，磷酸缓冲液是公认的能够增强许多病毒的侵染活性的接种缓冲液（Yarwood，1952；Fulton，1964）。破坏植物细胞会使病毒暴露于次生代谢物中，这些代谢物能够影响病毒的侵染活性。植物的核酸酶和多酚的氧化产物能够影响病毒的结构和稳定性，植物汁液中还有许多其他物质可影响病毒的成功侵染。前者的影响可以通过添加用于病毒提纯的添加剂来去除（第4章），后者的影响可以通过稀释病汁

液来去除。可以根据寄主的特性设计专用的含有添加剂的缓冲液，以达到成功侵染的目的（Martin and Converse，1982）。

一个能够克服抑制剂问题的另一个方法是在液氮中将发病组织研磨成粉末并用细毛刷直接接种（Lawson and Taconis，1965；Ragetli *et al.*，1973）。

B. 接种

当在接种前将研磨剂加在接种体中或撒于叶表面时，能够显著地提高机械接种的效率。常用的研磨剂是金刚砂（carborundum）（400～500 目）或硅藻土（diatomaceous earth），如塞利特硅藻土（Celite）。使用研磨剂获得的局部病斑数量的增加因病毒和寄主的不同而异，但一般为 100 倍或更多。这些材料加入的时机是非常重要的。在研磨和稀释之后加入硅藻土要比在研磨之前加入更为有效（Yarwood，1968）。

以前的方法是将接种物滴到叶片上，然后用针刮或刺破叶表面以形成伤口。这种方法的效率很低，现在已被更有效的传播方法所取代：用适当的工具沾上接种体轻轻地摩擦叶表面。根据操作者的爱好和接种物的体积，有许多种工具可供选择（Walkey，1991；Dijkstra and de Jager，1999）。在机械接种中使用的工具是为了在叶表面形成大量的微伤口但不引起细胞的死亡。接种时所用压力的大小取决于多种因素，如植物的种类、叶片的龄期和状态以及接种物中的添加剂。如果一天之内在接种过的叶片上就出现了肉眼可见的死亡组织，则说明伤口过重。对某些病毒和寄主而言，较重的伤口更有利于传播（Louie and Lorbeer，1966）。对其他一些病原，如 CTV（可能局限于韧皮部）、TBRV 和 CEVd，用沾有病毒的刀片切割或砍掉植物的茎是最有效的机械接种方法（Garnsey and Whidden，1973；Garnsey *et al.*，1977；Bitterlin *et al.*，1987）。将病毒接种到玉米和大麦籽粒的维管穿刺技术已经成功地用于 MWLMV 和 MRFV（Louie，1995；Madriz-Ordeñana *et al.*，2000）。基因枪轰击技术已经用于接种病毒（Franz *et al.*，1999）和病毒 RNA（Klein *et al.*，1987）、RNA 病毒的 cDNA 克隆（Gal-On *et al.*，1995；Gal-On *et al.*，1997；Fakhfakh *et al.*，1996）和克隆的 DNA 病毒（Garzon-Tiznado *et al.*，1993；Gilbertson *et al.*，1991；Hagen *et al.*，1994）。RNA 病毒的 cDNA构建物包含一个启动子，通常为 CaMV 的 35S 启动子（参见第 7 章第Ⅳ节 C. 1），用于表达侵染性的转录体；DNA 病毒的 cDNA 构建物利用病毒的启动子但必须保证导入的基因组能够有效地复制（见下文）。基因枪轰击接种能够使一些病毒侵染，已经证明这些病毒通过机械方式传播是非常困难的，甚至是不可能的，但有一些病毒，如 RTBV，使用这种方法却无法传播（Dasgupta *et al.*，1991）。

Holmes（1929）认为，在接种之后立即用水冲刷接种的叶片能够增加局部枯斑的数量，并且这已经成为普遍应用的措施。尽管如此，接种后冲刷叶片、喷水或浸泡叶片也可能充分减少某些病毒引起的局部枯斑的数量或者因其他条件的不同而产生不同的影响（Yarwood，1973）。用水冲洗或浸泡叶片对枯斑数量的影响可能取决于许多因素，尤其是某些侵染的抑制剂是否存在于接种物中。如果确实存在着抑制剂，则冲洗可能会将其影响降到最低。

如果接种后叶片很快干燥（可以使用吸水材料或吹风机），可能会增加局部枯斑的数目，但具体效果是有差异的（Yarwood，1973）。

Polson 和 von Wechmar (1980) 使用电渗法 (electroendosmosis) 介导 MSV 通过切开的叶柄伤口导入叶片能够成功侵染，然而该病毒通常只能由叶蝉传播。Konate 和 Fritig (1984) 描述了一个有效的显微接种的程序允许对预先确定的叶片上的个别侵染点进行机械接种后的早期事件的研究。有时使用皮下注射器将病毒注射到叶柄或茎内，虽然已经证明显微注射毛状体细胞在研究病毒的细胞间移动方面非常有用 (Derrick *et al*., 1992)，但除了使用医用的高压血清注射器接种 BCTV 外 (Mumford, 1972)，这种方法一般效率很低。然而，将已转化到根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 中的侵染性病毒构建物注射到植物中已被证明是一种非常有效的方法，特别是那些用机械方法很难传播的病毒。在这一称为土壤杆菌接种 (agro-inoculation) 的过程中，首先将病毒基因组克隆到根癌土壤杆菌 Ti 质粒的 T-DNA 上，然后转化到根癌土壤杆菌中，最后将其注射到寄主中。这个系统最初是为侵染双子叶植物的 CaMV 而设计的 (Grimsley *et al*., 1986)。过去认为根癌土壤杆菌不能侵染单子叶植物，但是 Grimsley 等 (1987) 指出，如果细菌培养物中包含一个含有串联重复的 MSV DNA 序列的质粒，那么双生病毒就可将其接种到完整的玉米植株上，随后植株表现出 MSV 引起的症状。这种接种方法已经用于许多不能机械传播的双生病毒 (Donson *et al*., 1988; Kheyr-Pour *et al*., 1994) 和 RTBV (Dasgupta *et al*., 1991)。如同基因枪轰击一样，用于土壤杆菌接种的 DNA 病毒构建物必须能够在寄主体内起始复制和转录。通常对于双生病毒二聚体的基因组是适用的；对于经过反转录的病毒（如 CaMV 和 RTBV）"稍长于基因组的构建物" (one and a bitmer) 能够转录出 35S RNA（第 7 章第Ⅳ节 C.1 部分）。看来根癌土壤杆菌的一些株系有某种专化性可使其有效地将病毒传播到单子叶植物中 (Boulton *et al*., 1989a; Dasgupta *et al*., 1991)。RNA 病毒的 cDNA 也可有效地利用土壤杆菌接种 (Leisner *et al*., 1992; Turpen *et al*., 1993)；就如同基因枪轰击接种一样，这些构建物必须包含一个适当的启动子。

接种大量的植物一般是费时的过程，可以采用许多不同的方法来减少所需的时间。例如，在移植时于接种物中浸泡秧苗的叶子是一种快速的接种大量秧苗的方法。大量的叶片用相同的接种物接种时，用画家的气刷喷雾的方法已证明是有效的 (Whitham *et al*., 1999)。另外，也可以用固体粒子流的形式接种 (Louie *et al*., 1983)。Laidlaw (1987) 提出了一种快速且灵敏的方法，即使用一种专门设计的气枪。必须做大量的个体检测时，为了避免洗刷研钵和研棒或其他的玻璃器皿，用发病的叶片直接摩擦供试植物的叶片也可能是一种有效的接种方法 (Murakishi, 1963)。

第Ⅱ节　影响侵染和发病过程的因素

对于特定的植物和病毒，有多种因素影响到侵染的过程和病情的发展。将一种病毒接种到植物上的方式可能是重要的。有时病毒的许多不同的株系能够在同样的条件下对相同的寄主引起不同的症状（第 17 章）。在本节中，我们将讨论寄主本身固有的各种可变因素以及环境因素；不同病毒之间以及病毒与病害的其他因子间的互作已在第 10 章第Ⅴ节讨论过。

A. 待接种的植物

有时一种病毒可通过接种子叶而不是最初的几个真叶来进行机械传播，如甘薯的一种病毒即是如此（Alconero，1973）。机械接种根部是很不方便的，而且相对于接种叶片而言很难成功。尽管如此，很多病毒通过这种方式接种已经获得成功（Moline and Ford，1974）。

1. 感病性

在一般情况下，太幼嫩和太老的叶片相对于完全展开的较幼嫩的叶片而言不易感病。感病性随叶龄的增长呈现出明显的梯度（图 12.1）。图 12.1 的曲线可以说明单个叶片的感病性随时间而变化的情况。现在必须考虑寄主对病毒侵染的反应方面的新的发现（参见第 10 章）。

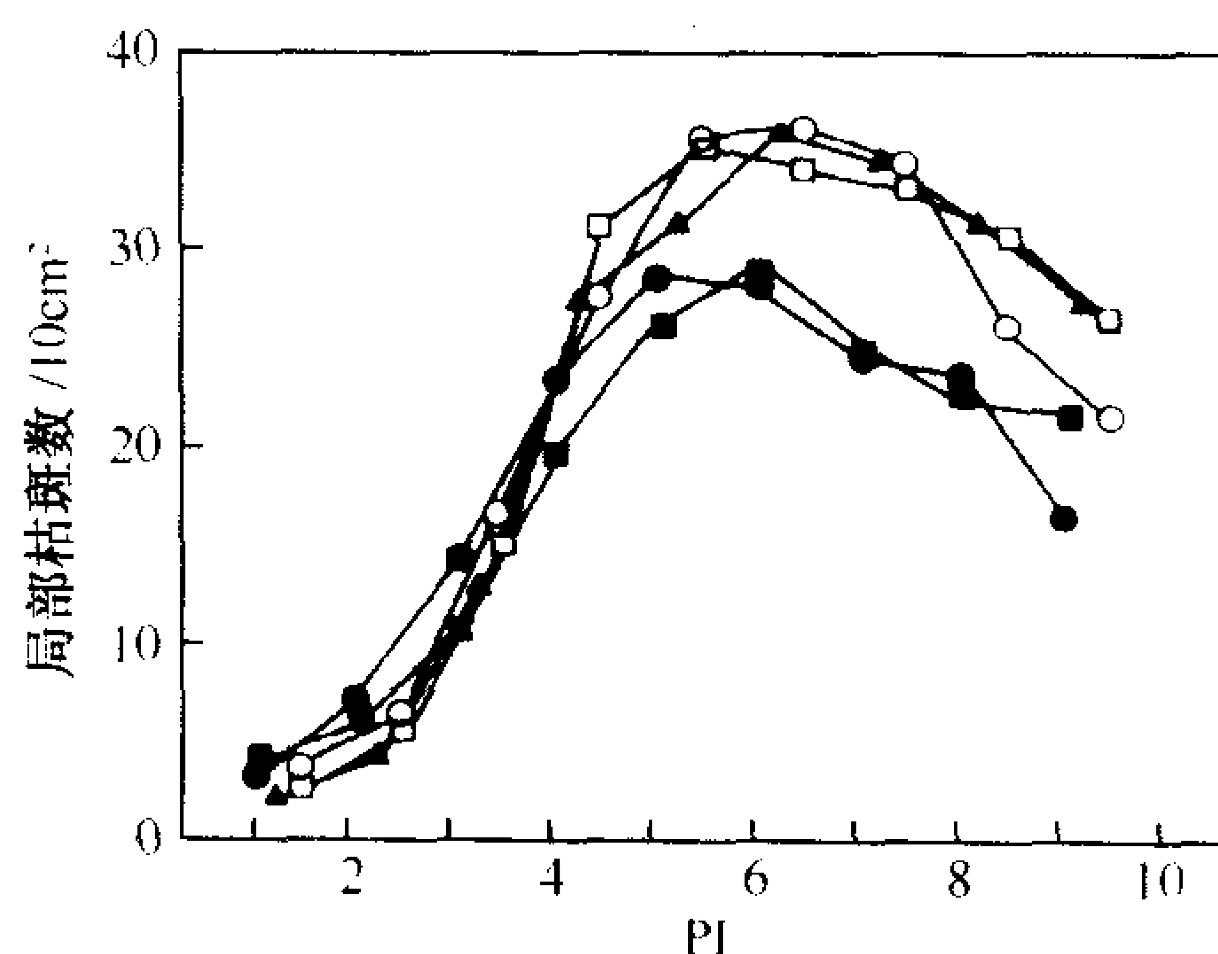


图12.1 叶龄对 TMV 侵染三生烟(Samsun NN)产生的枯斑数的影响。由于幼叶在不断伸展，单位叶面积的枯斑数是通过接种时的叶面积来计算的。间隔期(plastochron)指的是两个连续(相邻)的叶片所对应的发育阶段之间的时间间隔。叶片间隔指数(plastochron index，PI)是一个任意的测度(arbitrary measure)，用来比较发育期有细微差别的植株。每个曲线代表一个植株上连续的叶片。PI●，15.10；■，15.12；▲，15.30；，15.52；，15.53．承蒙版权所有者(© Blackwell Science Ltd.)惠允，引自 Takahashi(1972b)。

梯度并非都如上图所示那样的形式。在 8～10 叶期的心叶烟植株上，TMV 会在中部和下部的叶片而不是在较幼嫩叶片上产生更多的局部枯斑。与此相反，TBSV 在最老的叶片上可能不产生病斑，而在最幼嫩的叶片上产生的病斑最多（Bawden，1964）。

脱落酸能够加速叶片衰老的过程。外源施用的脱落酸能够提高三生烟叶片对 TMV 的感病性（Balázs *et al.*，1973），说明脱落酸这种激素在叶片感病性随叶龄变化方面可能发挥某种作用。

2. 环境因素

植物在接种前、接种时、接种后生长的环境条件能够对侵染的过程产生深远的影响。一种植物对于特定的病毒在某种条件下是高感病性的，而在另一种条件下可能就是完全抗病的。当侵染发生时，植物因环境条件的不同，可能对病毒侵染提供或高或低的支持，这就有可能发展为严重的病害或维持在几乎不显症的状态。

3. 影响感病性的因素

任何能够导致叶片表面受伤的因素都有可能使机械接种获得成功，同时叶片内的生理变化能够使细胞不同程度地更适于病毒的定殖。从广义上讲，在以下条件下培养和利用的温室植物的感病性最强：①矿物质营养和水分的供应未限制生长；②中等或稍低的光照强度；③温度 18～30℃，据病害和寄主的具体情况而异；④下午接种。在这些条件下生长的植物抵抗力较低，不同于按正常的园艺目的而培养的植物。

a. 光照

光照对感病性的影响可分为两种情况：光强在一两天内的短期改变，以及明显地影响植物生长的长期作用。

Bawden 和 Roberts（1947）发现，降低光强或全天都是完全的黑暗会提高一些寄主对某些病毒的感病性。在接种前大约一天的遮阴或黑暗对植物的影响常被应用到实践中，即提高供试植物对难以传播的病毒的感病性。

许多试验表明光照具有两种作用相反的影响：一方面过度的光照会降低感病性；另一方面，在一段黑暗之后，即使短暂曝光也能增加局部斑的数量。例如，当豆类植物在接种前经过 18 h 的暗期然后给予 1 min 的光照，TNV 接种产生的局部枯斑的数量会比在最小光照下接种时加倍（Matthews，1953b）。在几乎所有的关于光照影响的研究中，供试植物都是在普通的温室条件下培养的。因而，任何实验上的变化都会影响感病性的变化。一天中实验的具体时间也会影响结果（Matthews，1953b）。

至于光照对感病性的长期影响，人们发现对供试植物强光照射一段时间能够降低植物的感病性，相反的弱光照能够增强感病性。

更进一步的考虑是光照的质量。在春天和秋天适宜的气候条件下生长的植物一般比在夏天和冬天生长的植物更感病，并能产生更多的病毒。即使增加光照，自然光的质量和自然光长的可能变化也会影响病毒的产量。

b. 温度

一般而论，在接种前用比正常稍高的温度预培养植物能够增强感病性。在接种后用较高的温度处理植物的效果因供试病毒而异（Kassanis，1952）。在接种后短暂的热激处理（如 50℃）会影响随后产生的病斑的种类（Foster and Ross，1975）。就坏死环斑型局部斑的诱发而言，光照与温度条件的相互作用会导致环纹的产生（Harrison and Jones，1971）。光照可能还影响病毒通过嫁接传播的速度和效率（Fridlund，1967a）。

c. 水和湿度

用水冲洗接种叶片的直接影响已经在第Ⅰ节 B 部分讨论过。一般而论，如果植物在最低限度的水分供应条件下生长，它们会不同程度地矮小，叶部纹理细密，并且相对于水资源丰富的条件下生长的植物而言局部病斑的数量显著地减少。例如，Tinsley（1953）发现较好的给水条件下生长的心叶烟产生的局部枯斑数是缺水条件下的烟草的 10 倍多。

许多报道认为在接种时中等程度的萎蔫能够增强感病性。例如，在接种 TMV 之前，大豆叶片萎蔫失水 0～15％能够提高感病性。更严重的失水（在 15％～29％）会降低感病性。当接种后的叶片萎蔫时，在 0～35％的范围内，局部枯斑的数量会随缺水程

度的增加而上升（Yarwood，1955），比不萎蔫的叶片最多可增长4～8倍。

d. 营养

寄主的营养条件对病毒能够产生的局部枯斑的数量有显著的影响。一般预计，不同营养条件之间的互作是十分复杂的。例如，Bawden和Kassanis（1950）调查了不同水平的氮、磷、钾对普通烟和心叶烟植株对TMV株系感病性的影响。不同范围的肥料处理对植物生长有较大的影响，而且在感病性上引起许多显著的差异。一般来讲，对植物生长非常有利的营养条件也同样会增强感病性。还没有证据表明特定元素自身能够提高植物的感病性。

痕量元素（trace element）也能够影响传播率。例如，在PSTVd侵染赛莨菪属（*Scopolia*）植物叶片时，增加锰的供应量会引起局部枯斑数目的显著增加（Singh *et al.*，1974）。

e. 一天内的时间

由于叶片中发生的许多基本过程受到昼夜周期交替的影响，叶片对机械接种的感病性随一天中的具体时间而系统性变化并不令人感到稀奇。接种叶片上产生的局部枯斑的数目在下午上升至最大，而在夜间降至最小，特别是在拂晓前（图12.2）。

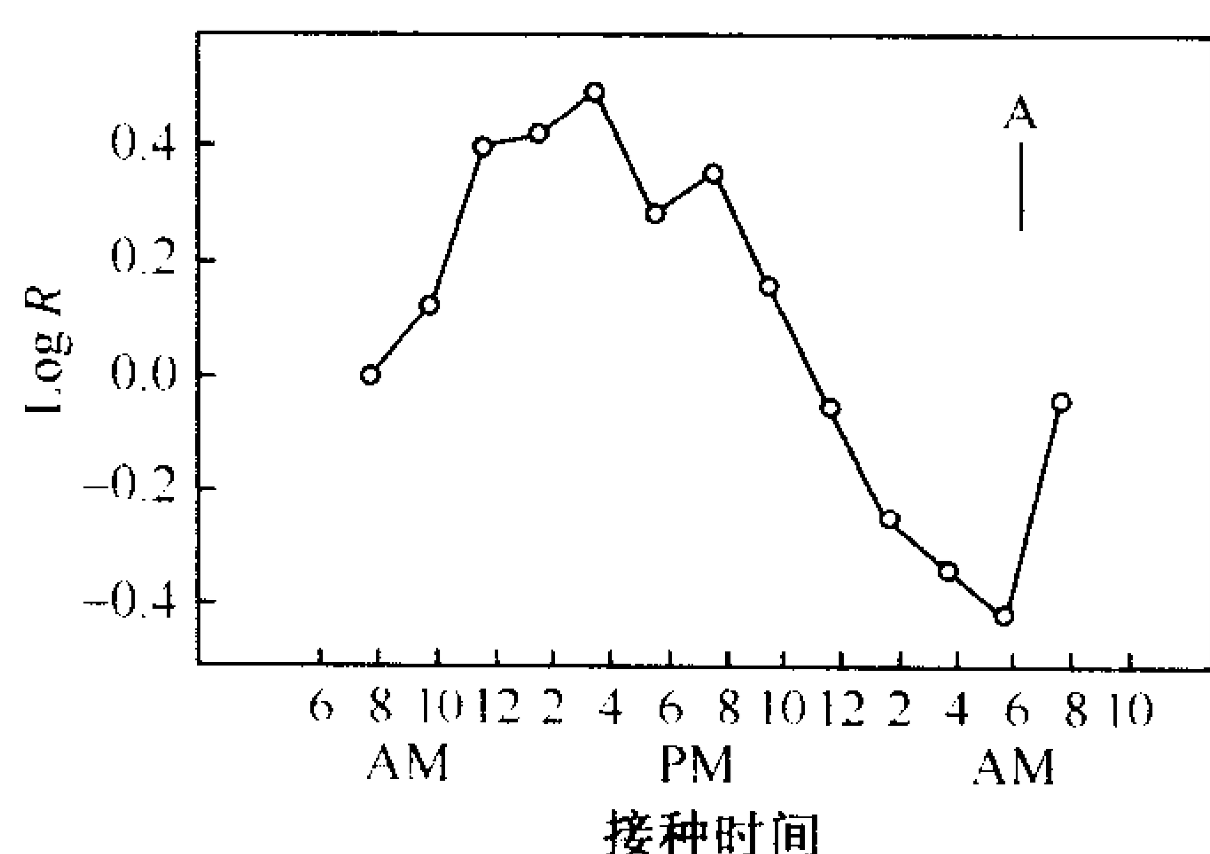


图12.2 接种时间对TNV侵染菜豆植株产生的枯斑数的影响。Log R使（一天中的特定时间）产生的枯斑数与在基准时间（上午8点）所产生的枯斑数相关。短线A代表显著性为$P=1\%$时任意两点之间的差异。承蒙惠允，引自Matthews（1953a）。

已经在各种各样的寄主-病毒的组合中发现了这种昼夜变化。这种昼夜变化并不依赖于环境条件的即时变化，但看来是内在性的，类似于叶片的一些其他的生理过程。因而，在下午4点时将豆科植物放在温度不变的黑暗条件下并且在接下来的一天中维持黑暗条件，与处于正常光周期条件下的植物表现出非常相似的感病性的变化（Matthews，1953b）。

f. 一年内的时间

季节间的气候差异巨大，因此植物对病毒的感病性随季节的不同而发生很大的变化。例如，在英国洛桑（Rothamsted）的夏季生长的某些特定品种的菜豆（*Phaseolus vulgaris*）表现出对CMV的免疫性。而在冬季，它们能产生一定数量的局部坏死斑（Bhargava，1951）。与此类似，但不这样极端的情况就其他产生局部斑的病毒而言也有记录。Bawden和Roberts（1947）发现植物对冬天条件的典型反应能够在夏天的适当遮阴条件下重现，因此与温室培养的植物有关的主要环境条件可能是光照。

g. 化学品和机械损伤

杀线虫剂和杀菌剂的应用都会使植物更易受到病毒的侵染。例如，阿特拉津能够提高杂交玉米对MDMV的感病性（MacKenzie *et al.*，1970）。

在移植小麦植株过程中造成的机械损伤导致了来自土壤中的WSSMV的传播加剧（Slykhuis，1976）。

B. 病害的发展

1. 接种物中的病毒浓度

感染病毒的数量能够影响随后植物生长受到抑制的程度［比较图 12.3(A)和(B)］。实际上，这也许是植物生理龄的影响，因为在机械或昆虫高强度接种之后病毒很可能在植株内进行系统移动。但是，人们还没有发现由于蚜虫数目的增加导致植物的生长降低的情况（Skaria *et al.*，1984）。这种明显的偏差可能在于所用的蚜虫数目。为了获得如图 12.3 所示的效果，高强度接种过程中可能需要使用 100 头或更多的蚜虫来接种每个植株。

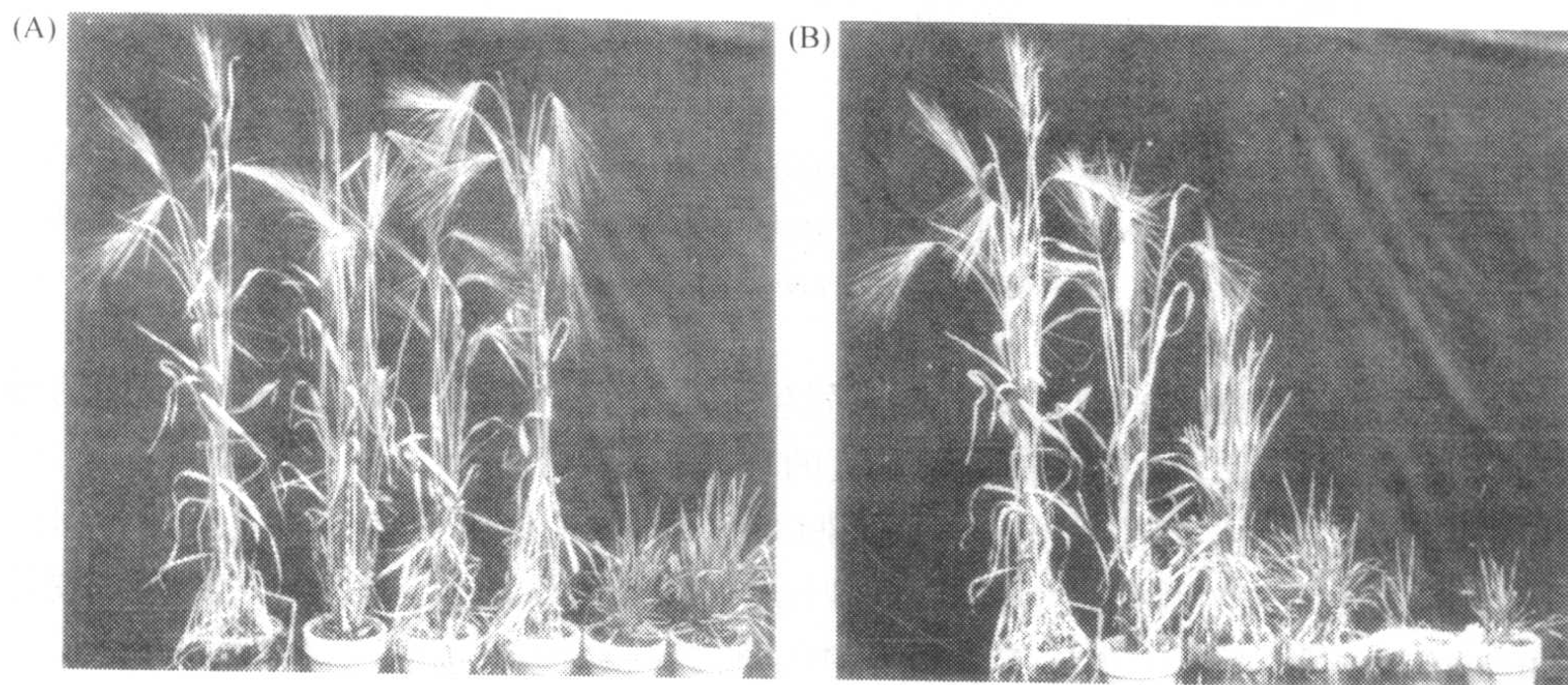


图 12.3　侵染时间和传染性蚜虫的数目之间的相互作用抑制了随后的 BYDV 侵染大麦造成的枯斑的大小。(A) 每株 8 头蚜虫；(B) 每株 150 头蚜虫；接毒期为两天，因而蚜虫接种取食造成的危害可以忽略不计。侵染时的生长期：从左到右分别为对照、开花期、孕穗期（boot stage）、分蘖期（tillering）、三叶期和一叶期。承蒙惠允，引自 Smith（1967）。

2. 环境因素

a. 光照

在不同的方法中，用不同的病毒接种，强光或者持续的光照能够影响病毒的产量和病害的表现，但是，一般来说，强光和长期光照有利于病毒的复制。例如，已分离的菜豆（*P. vulgaris*）的叶片在接种 AMV 后，在 25℃条件下，保持在湿润的培养皿中，如果在持续的光照下，17 h 后能够形成局部斑，然而在实验室较弱的光线照射下可能需要 30 h 才能形成局部斑（R. Hull，尚未发表的观察结果）。

b. 温度

在植物能够正常生长的一定温度范围内、温度升高通常能够促进病毒的复制和病毒在植物体内移动的速度。但是，像其他生物学现象一样，在某个温度点之上温度的提高能够降低病毒复制的速度；寄主植物的种类、病毒的株系和复制病毒所在叶片的生理龄在病毒行为随温度而变化的方式上可能是主要的影响因素。图 12.4 描绘了温度对

TMV 复制的一些影响。

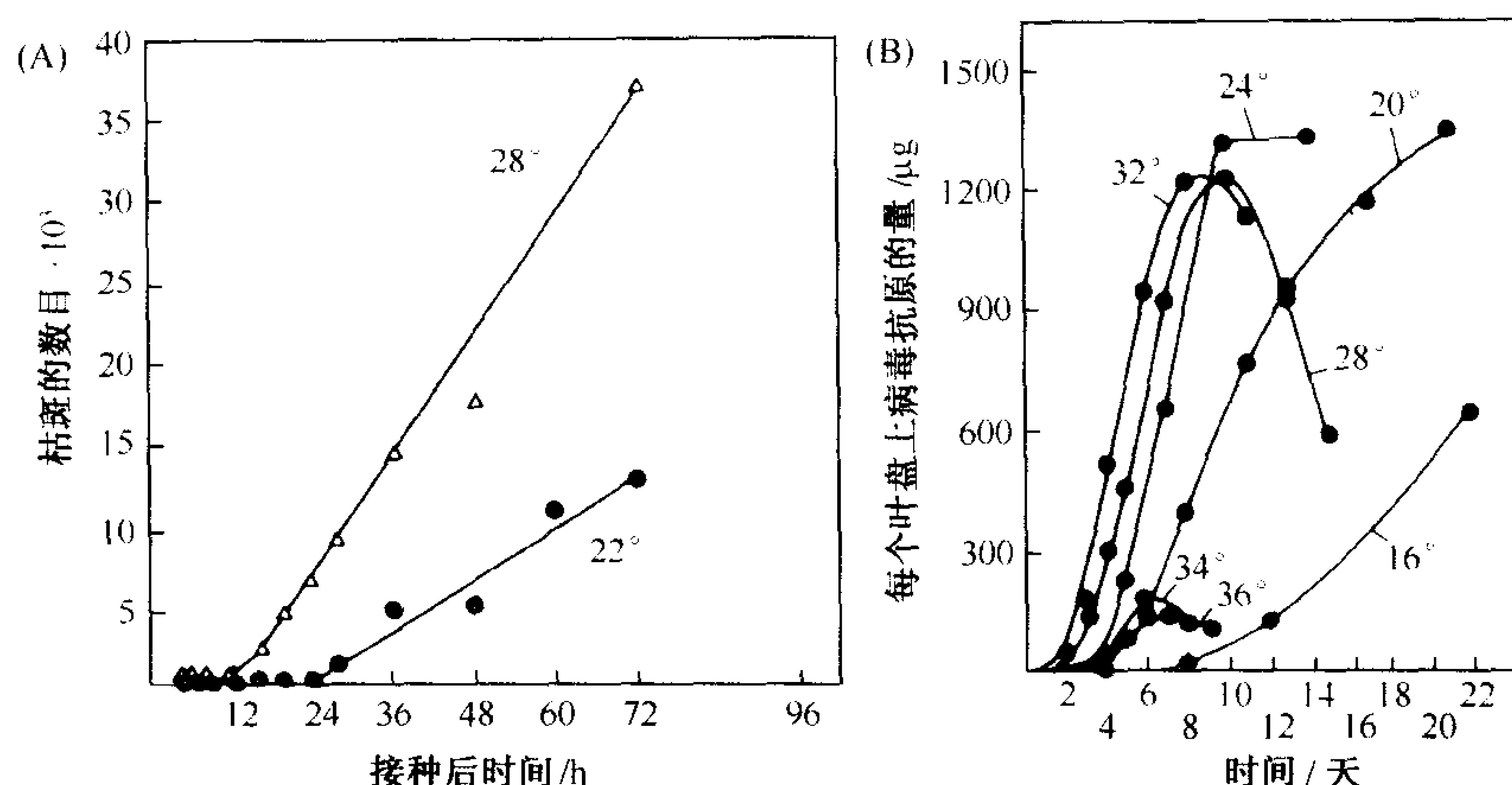


图 12.4 温度对 TMV 复制的影响。(A) TMV 在烟草叶肉细胞原生质体中复制时程 (time course) 的线性化图。承蒙惠允，引自 Dawson 等 (1975)。(B) 温度对 TMV (普通株系) 在烟草叶盘中复制的影响。病毒浓度是用血清学方法测定的。承蒙惠允，引自 Lebeurier 和 Hirth (1966)。

植物生长的环境温度时常影响到病害发生的类型。例如，在被红叶病毒侵染的地三叶草中，色素形成的类型依赖于植物生长的环境温度 (Helms *et al.*, 1985)。生长在 24℃的环境中的一些大豆品种被 SMV 侵染以后，产生了严重的茎尖坏死；但若保持在 28℃条件下，大多数的植株发生典型的花叶病 (Tu and Buzzell, 1987)。被 BSV 侵染的大蕉和香蕉在 22℃的生长条件下表现出明显的症状，但是当把这些植物转移到 28～35℃的条件下生长时，这些症状有所减弱甚至消失 (Dahal *et al.*, 1998)；当植物被转移到原来较低的温度条件下，则症状再度出现。在有症状的植株中，病毒的浓度明显较高。但是，这不一定是温度影响的必然结果，还可能是由于光的强度和质量的变化所致。

较高的生长温度能够抵消一些过敏性反应相关基因的影响。例如，在含有 *N* 基因的烟草中，在 36℃条件下 TMV 能够引起系统性病害，但是在 28℃或更低的温度条件下，它却表现出过敏反应 (Kassanis, 1952)。然而，马铃薯中针对 PVX 引起过敏反应的 *Nx* 和 *Nb* 基因的活性则不受高温的影响 (Adams *et al.*, 1986)。

在最初系统症状出现以前，若将温度提高到一定程度，能够提高系统性移动的速度因而缩短潜育期 (incubation period) 时间 (Jensen, 1973)。在导致病毒增殖量最大的温度下，系统侵染的潜育期不一定最短。将植物保持在不同的温度条件下，病害症状的严重度和病毒的浓度之间可能有、也可能没有近似的相关性。例如，在 16～28℃范围内，烟草中的 TMV 和 PVX 有这样的相关性 (Bancroft and Pound, 1954)。

在植物生长温度范围内的温度变化可能导致那些能够适应特殊条件的某些株系选择性地增殖 (参见第 17 章第Ⅲ节 F.2 和第Ⅳ节 A.3)。我们将在 16 章 (第Ⅱ节 C.2.b) 讨论热疗法的实际应用。

c. 水分供应

水分供应对病毒复制方面的影响还没有得到系统的研究。长期的缺水形成的矮小的

"坚硬"植株通常不产生明显的症状。在ToMV侵染的番茄中，土壤水的充足供应增加了内部褐变病害的发病率（Boyle and Bergman，1967）。

d. 营养

许多研究已经致力于阐明寄主植物的营养对病毒复制的影响，尤其是在烟草植株中的TMV。许多结果是矛盾的，可能是由于植物种植方法的变化、供给营养的有效浓度、应用的病毒株系、检测病毒的方法和表达结果的基础不同而造成的。那些对植物生长最有益的营养元素的供给为病毒的复制提供了最佳的条件。例如，Bawden和Kassanis（1950）推断氮和磷的供应对TMV复制的影响与对植物生长的影响完全紧密地联系在一起。给植物生长提供较好的营养则病毒的产量将会明显提高。那些钙元素供给较少的豌豆被PLRV侵染以后将表现出严重的矮化（Thompson and Ferguson，1976）。

微量营养元素（锌、钼、锰、铁、硼与铜）对植物支持病毒复制的程度有着不同的影响。对病毒积累的影响通常和对植物生长的影响是相平行的，但是也有例外。例如，锰的缺乏导致了叶片中TMV浓度的提高。与此形成对照，豇豆中这种元素的毒性浓度能够导致CCMV的复制明显增强。

e. 一年中的时期

这些复杂的因素包括日照长度、光照的强度和时间、空气和土壤的质量以及水的供给量均随季节而变化，将会影响到植物的生长、病毒侵染造成的病害和病毒复制的程度。例如，苜蓿中AMV的浓度有季节性变化，在春天AMV的浓度较高，在秋天AMV的浓度较低（Matisová，1971）。一些病毒，像马铃薯中的PLRV和甜菜中的BYV在夏天比在冬天能够引起更多不同的症状。其他情况，像马铃薯中的PVX则在冬天时能够引起更严重的病害。受AbMV侵染的苘麻属（*Abutilon*）植物叶片中叶绿体超微结构变化的严重度表现出明显的季节性变化，在夏天表现最为严重（Schuchalter-Eicke and Jeske，1983）。

3. 系统性传播

在相当成熟的烟草或者番茄植株的较幼嫩叶片上接种TMV后，下面的叶片若未受到直接接种则可能永远不会被病毒侵染。随着植株龄期的增加侵染将更趋向于局部化。像在有关病毒运动的讨论中（第9章）提到的那样，与实际龄期相比生理龄是更重要的因素。当马铃薯植株在田间被PVX自然侵染或接种后，在最初的季节结束时一些块茎可能还没有受到病毒的侵染。Beemster（1966）发现被PVY侵染的块茎和芽眼（eye）的比例与接种植株的时间密切相关。例如，若植株生长8周后进行接种，块茎被侵染的比例是100%；若在植株生长13周后进行接种，则块茎被侵染的比例只有25%。侵染时间通常是决定重要经济作物产量损失的一个重要因素。例如，禾谷类作物在生长阶段的早期被BYMV侵染后，产量的损失一般更加严重（Smith，1967）（图12.3）。

在辣椒的田间试验中，植株的生长和果实的产量增加几乎与用CMV接种植株的晚迟程度成直接的比例关系（Agrios *et al.*，1985）。"成熟植株的抗性"（mature plant resistance）这个术语已经用于指那些植株的龄期效应，但是其机制还不清楚。随着叶片的老化会发生许多代谢变化，如核糖体含量降低（Venekamp and Beemster，1980）。但是，还没有建立这些变化与病毒接种后植株抗性提高的相关性。Woodford（1987）描

述了晚期侵染的长期影响。从前一个生长季节的晚期被 PLRV 侵染的块茎生长出来的马铃薯植株通常表现出较轻的症状，但它们却含有与表现严重症状的植株中一样多的病毒。这或许是株系的选择过程发挥了作用或植株对自然侵染的反应有了变化（参见第 17 章）。

4. 寄主反应的类型

对病毒抗性的遗传或分子方面的细节分别在第 16 章和第 10 章加以讨论。

C. 病毒核酸用作接种体

对于任何含有 ssRNA（以及许多含有 ssDNA 或 dsDNA）作为其遗传物质的病毒，原则上讲应当可以从受病毒侵染的植物组织或者器官中提取总核酸，然后用来接种健康的植株。当用整叶的抽提物接种无效时，该方法可以用于病毒的机械传播。这种方法之所以成功是由于把病毒的抑制剂移入到酚相或中间界面中（或通过其他方法）而使其去除，或者酚抽提除去了那些使病毒不稳定或不完全的核酸酶。对于一些组织或病毒而言，在含酚的缓冲液中研磨或混合过程可能会将在正常汁液抽提物中处于结合状态的病毒释放出来。一旦酚被去除，则酚提取物或 RNA 制备物的侵染性（病毒核酸）对玻璃器皿上污染的核酸酶非常敏感，但在用该抽提物接种前必须将酚去除。

D. 感受点（infectible site）的性质和数目

1. 叶片表面的性质

叶片的上表面经常用于机械接种，它有 $1\times10^6\sim5\times10^6$ 个不同类型的细胞。叶片表面的结构如图 12.5 所示，详细结构请参见 Esau（1977）。叶片的最外层是上表皮（角质层）蜡质（epicuticular wax），在不同植物种类上蜡质的量、微细结构和化学组成可能有很大差异。上表皮的蜡质层在机械摩擦接种期间对叶片上表面的湿润度（wettability）有强烈影响。

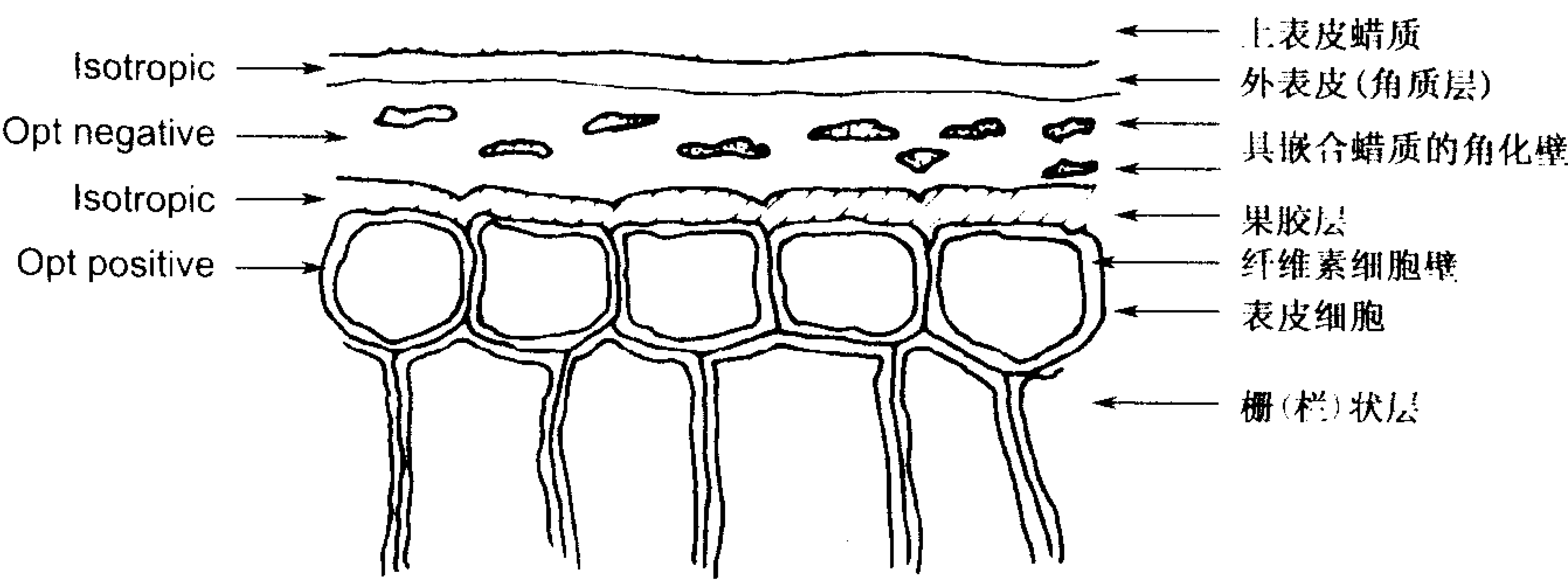


图 12.5 阻碍病毒侵染的屏障。植物上表皮（epicuticle）的横切面示意图。在表皮细胞上面的分层线表示在组分构成中发生主要变化的区域，而不是明确的分界线。特定种类的植物与这种普通的排列可能相差很大。承蒙版权所有者（© American Association for the Advancement of Science）惠允，引自 Eglinton 和 Hamilton（1967）。

2. 感受点的性质

将病毒放在完整叶片表面上不能直接发生侵染，必须在叶片的上表面造成伤口，使其穿过惰性的叶片表面。可能叶片表面上某些类型的细胞比其他类型的细胞对伤害更加敏感。通过微侵染（microinfection）方法可直接证明，病毒可以被引入叶毛中，但是侵染的比例却很低（Zech，1952）。看来可能组成上表皮的所有类型的细胞都有通过机械接种而被侵染的潜力，外皮（cuticle）可能是侵染的最大障碍。直接穿透外皮和细胞壁的伤口在允许病毒侵入方面可能是有效的，折断的毛状物可能是很普通的侵入途径（图 12.6）。有一些报道提出，植物细胞通过外壁胞质连丝（ectodesmata）和排水器（hydothode）直接与环境接触。外壁胞质连丝又称 ectoteicoides，不同于胞间连丝（Franke，1971），在大多数情况下，它们不是病毒侵入的位点。用一些病毒做的实验表明：在机械摩擦接种后，位于下部的一些叶肉细胞可能会被接种体直接侵染（Salinas Calvete and Wieringa-Brants，1984；Matthews and Witz，1985）。

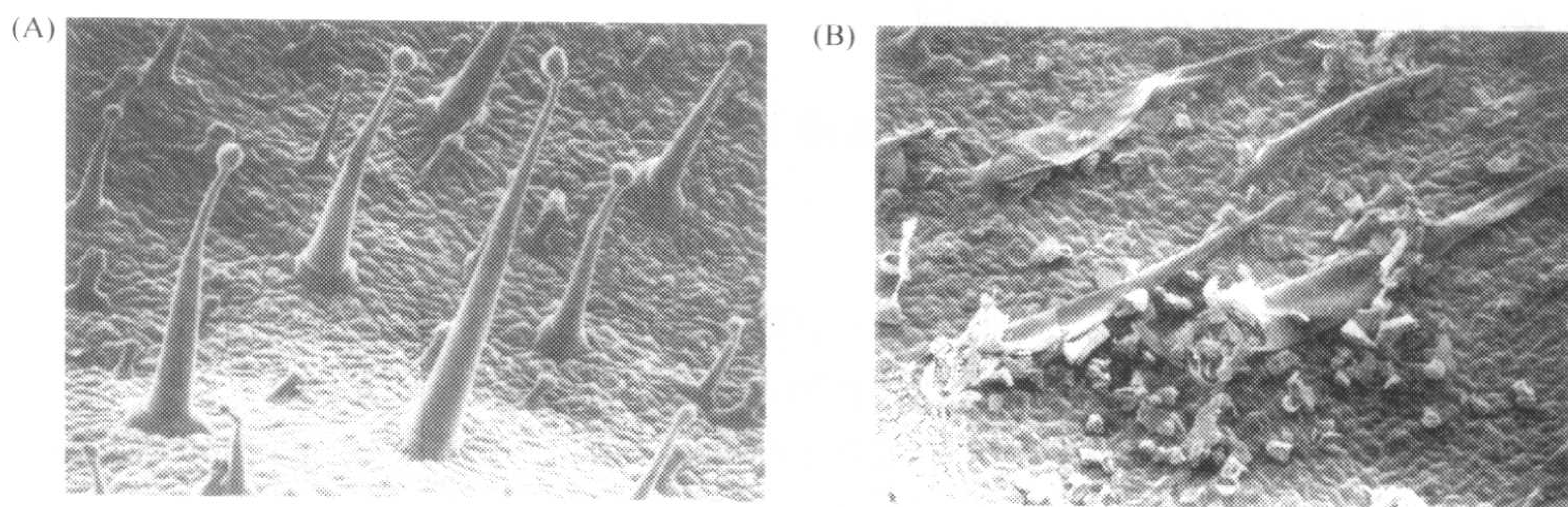


图 12.6 在机械接种前后心叶烟叶片表面的扫描电镜照片。（A）未处理的叶片可以看到完整的叶毛和表皮。（B）摩擦接种后叶毛受损，可以清晰地看到金刚砂粒子。承蒙 M. J. W. Webb 提供照片。

排水器为位于叶缘的包含水孔的结构（Cook *et al.*，1952），与胞间隙和木质部的维管系统相连接。在水分摄入和有限的蒸腾作用条件下，如在黑暗中温暖的土壤和较高湿度的情况下，在一个称为吐水（guttation）的过程中液体通过排水器被排出。在番茄的吐水中发现了 TMV 的粒体（Johnson，1937），在番茄和千日红的吐水中发现了 ToMV 的粒体，在辣椒的吐水中发现了 PPMV 的粒体（French *et al.*，1993），在黄瓜的吐水中发现了将近 10 个属的病毒粒体（French and Elder，1999），在大麦的吐水中发现了 BMV 的粒体（Ding *et al.*，2000）。在胞间隙发现了 BMV，而且在木质部发现了 ZYMV（French and Elder，1999），但是病毒如何到达那里尚不清楚。

3. 来自侵染稀释曲线的证据

对于产生局部枯斑的数目和接种体的稀释度之间的关系我们将在第 15 章有关病毒测定的部分加以讨论。为了解释稀释曲线的性质已建立了各种理论模型（Fulton，1962；Furumoto and Mickey，1967；Gokhale and Bald，1987）。在相同的寄主上 AMV（需要 3 个病毒粒体）和 TNV（可能只需要一个病毒粒体）的稀释曲线分别在图 15.2

中列出。尽管在图 15.2 中两种曲线的区别十分明显，但是它们自己的稀释曲线并不能用来确定病毒的基因组是包含在一个、两个或者三个粒体内。还有许多其他的因素导致了不同实验之间曲线斜率的不同（参见第Ⅱ节 A.1）。

4. 伤后感受点的维持时间

研究伤口保持可侵染性的时间一般是通过在摩擦后的不同时间把叶片浸泡在接种物中，计算叶片上随后出现的枯斑数目。一般来说，在摩擦之后感受点的数目下降很快。例如，Furumoto 和 Wildman（1963a）发现：心叶烟的叶片上 70%的感受点（受伤后的叶片在 TMV 中浸渍 2 s 可受侵染的位点）在 90 s 时丧失了感病性。其余的感受点在大约 1 h 后相继缓慢地丧失了感病性。但是并非所有的病毒和寄主都遵循这个模式。Jedlinski（1964）发现在摩擦后的最初 10 min 内感受点数目的增加、下降或保持恒定主要依赖于所测定的寄主和病毒系统。在叶片受伤前后有许多处理方法，它们均能够改变上述事件的进程（第Ⅱ节 A）。

E. 发生侵染所需的粒体数目

关于侵染所需的病毒粒体数目需要考虑 3 个方面的问题。

1. 成功侵染所需的粒体数目

叶片的机械接种已经被广泛认为是一个效率很低的过程。各种估测表明随后叶片上的每一个局部枯斑的产生需要 10^4～10^7 个病毒粒体（Walker and Pirone，1972a）。多分体病毒需要多于一种的病毒粒体，这就使接种的过程要比单分体病毒接种的效率更低。就 CPMV（两个组分）而言，产生每个枯斑需要机械接种 10^6～10^8 个粒体（van Kammen，1968），AMV（3 个组分）需要 10^8～10^{10} 个粒体（van Vloten-Doting，1968）。

在对机械接种效率的多数评估中，对供试叶片施用了相当大体积的接种物，并且计算了产生每个枯斑所用的病毒粒体的数目。但是，如果将病毒进行系列稀释，并利用较小体积的接种物，则所得到的发生侵染的限制性稀释度估计值将会低得多。因此，Walker 和 Pirone（1972b）发现在 2.5 μl 的接种物中含有 450 个 TMV 粒体就足以侵染烟草植株。即使利用更小的体积（0.1～1.0 μl），含有少至 10～30 个 TYMV 粒体就能够在大白菜上产生一个枯斑（Fraser and Matthews，1979a）。在机械接种的过程中效率的大幅提高可能有以下 3 个原因：①对所用的特定病毒粒体数目而言，体积愈小则病毒浓度愈高；②在短时间内，在较小体积中的一个病毒粒体比在较大体积中更有可能找到侵染位点；③快速干燥可增加局部枯斑的数目这一事实（参见第Ⅰ节 B）也可能是一个因素。

两种其他的方法也已用于确定侵染的效率：原生质体悬浮培养物的接种和细胞的显微注射。对于所接种原生质体的成功侵染，可以测定吸附到每个活细胞的病毒粒体数目，通常为所用接种体的 0.1%～1.0%。原生质体侵染的效率可以表示为使 50%的原生质体侵染的、吸附到每个原生质体上的病毒粒体平均数（ID_{50}）。有人从已发表的数种病毒的数据计算 ID_{50} 的值，得出其数值范围为 50～500（Fraser and Matthews，1979a）。在接种物中实际含有的粒体数目是这些数目的 100～1000 倍。因此原生质体接

种的效率在本质上不一定比叶片的机械接种的效率更高。此外，结合到原生质体上的病毒数目还受其他因素的影响，如温度、pH、离子强度和像聚乙二醇一类的添加化合物的存在等（Roenhorst *et al.*，1988）。

对于每一个成功的侵染来讲，实际上进入细胞的病毒粒体的数目只能用微注射法（microinjection）来测定。例如，Halliwell 和 Gazaway（1975）通过将 1 pl（皮升，10^{-12} L）TMV 粒体注射到一个烟草细胞中，获得的 ID_{50} 值为 310（个病毒粒体）。

2. 包含侵染性基因组的粒体的比例

在缺乏有效的接种方法时，不可能获得病毒制备物中侵染性粒体比例的明确估值，但是 Furumoto 和 Wildman（1963b）得出的结论认为，在纯化的制备物中 10 个 TMV 粒体中至少有一个具有侵染性。利用侵染性构建物或者侵染性转录物，侵染性分子的比例应该更高，但是那些没有被包裹的核酸在到达起始复制位点之前就可能已被核酸酶所降解。

3. 一个侵染性基因组能导致侵染吗?

一般认为，对许多病毒而言，侵染一个细胞或引起可见的枯斑实际上仅需要一个侵染性粒体或侵染单位（Boxall and MacNeil，1974）。稀释曲线的理论观点和这些数据相符合。原生质体实验表明仅一个 TMV 粒体就足以侵染一个原生质体（Takebe，1977）。Reddy 和 Black（1973）发现，二三个 WTV 粒体就足以侵染昆虫介体单层细胞内的一个细胞。但是从原生质体实验得出的结果一般不能直接适用于整个叶片的接种情况。

实际上，每一个成功的侵染都需要大量的病毒粒体，一个主要的因素几乎肯定是这个过程的低效性。这有许多可能的原因：①很可能仅有一小部分表皮细胞具有潜在可侵染的（从叶表面创下）的伤口。②可侵染伤口的持续时间很短，在伤口上面的液体中的许多病毒粒体从来不能和该位点接触。③按照单个细胞大小的表面区域，在叶片表面上所施用病毒粒体的分布很不均匀。④许多病毒可能被叶片表面的非活性区域所吸收并保留下来。⑤一些病毒粒体可能进入潜在可侵染的细胞，但是不能够成功定殖，除非以某种方式得到“拯救”（rescued）。对一些寄主/病毒组合而言，这类中心的存在已经被证实（Rappaport and Wu，1963）。

F. 田间的机械传播

同无脊椎动物携带传播或通过营养繁殖的传播相比，机械传播在田间扩散的意义通常不太重要。但是对某些病毒而言，机械传播有相当大的实际意义。TMV 能够很容易污染手、衣服和器具，它也能够被工人和偶尔在烟草和番茄作物中活动的鸟类传播（Broadbent，1963，1965a；Broadbent and Fletcher，1963）。在作物的早期生长过程中这是非常重要的，如在植物栽植（setting out）期间。在栽培操作如疏芽（disbudding）过程中或者由于风吹使健康植株和发病植株之间发生摩擦，早期被侵染的植株可作为进一步传播的侵染源。TMV 能够通过吸烟者机械传播，因为病毒经常存在于已加工的烟叶中。例如，在联邦德国销售的所有 37 种品牌的香烟中均含有 TMV（Wetter，1975），而另一个测验表明，在 64 种供试香烟中有 60 种检测出该病毒（Broadbent，1962）。

PVX 也能很容易被那些已污染的工具或机械和已经与发病的植株接触过的人员和动物所传播（Todd，1958）。在一些材料上该病毒可以保持活性达数周之久。

PVX 能够通过在相邻的植株之间叶片的直接接触（Clinch *et al.*，1938）或者叶片没有接触的相邻植株之间传播。这曾经被认为是由于通过根际的相互接触的机械接种，但是也不能排除栖居于土壤中的某种介体的可能性。一些果树病毒在果园里通过修剪工具而传播（Wutscher and Shull，1975）。田间试验表明 RCMV 能够很容易被割草机所传播（Rydén and Gerhardson，1978）。另外 Heard 和 Chapman（1986）还得出结论，在已经被割过草的黑麦草地上，RGMV 的局部扩散主要是因螨类介体的传播而不是割草操作所致。

G. 土壤中非生物性的传播

1. 地表面以上

Allen（1981）表明：在温室里，TMV 能够被含有病毒的土壤传播到与土壤相接触的叶片上。其他比较稳定的病毒可能也通过这种方式来传播。

2. 地表面以下

一些病毒在明显没有真菌和节肢动物参与的情况下，能够从被病毒污染的土壤中侵染植物的根部，如 TMV（Broadbent，1965b）、TBSV（Kleinhempel and Kegler，1982）、CRSV（Brown and Trudgill，1984）和 SBMV（Teakle，1986）。

温室中的番茄被植株碎片中的 ToMV 侵染的水平受到接种体浓度的影响（Pares *et al.*，1996）。当接种体的浓度下降时，侵染的水平也下降，并且更大比例的侵染是无症侵染或者被局限于根部。

H. 结论和讨论

机械接种已被用在植物病毒研究的许多方面，如寄主范围的研究、测定病毒的侵染性和病毒的诊断。接种的结果在很大程度上取决于植物被接种时的条件。一般来讲，供接种的植物在生理上应该是幼嫩的，这些并不一定适用于自然条件，但是仅有少数病毒在田间是通过机械传播的。这些病毒如 TMV 和 PVX，在侵染的植物中有较高的浓度，能够通过折断的叶毛被传播到相邻的植物上。我们还应该记住，人类很容易通过切割工具和农艺操作来有效地传播病毒（和类病毒）。

如第Ⅱ节 A.3 部分所述，植物对病毒侵染的感病性有昼夜变异。植物的一些基因的表达有生理节奏（Beator and Kloppstech，1996），了解它们是否与其感病性的昼夜变化相关将是很有意义的。

一系列植物通过吐水排泄病毒，这可能是病毒侵染的另一个途径。McKinney（1953）提出，人类在草坪上的活动可在植物间传播 BMV。最近的结果证明（Ding *et al.*，2000），BMV 存在于受侵染的大麦植株的吐水液（guttation fluid）中，这可能是人类与其他动物的活动导致机械传播的病毒来源。植物病原细菌可以通过排水器（hydathode）将病株的吐水液吸入健康植株中而被传播（Carlton *et al.*，1998；

Hugouvieux *et al.*, 1998)。然而，尚不清楚通过该途径是否可以导致病毒的侵染，因为病毒粒体必须找到从质外体（apoplast）或木质部导管（xylem vessel）进入感病细胞的细胞质中的途径。

第Ⅲ节　活体高等植物材料直接传播病毒

A. 通过种子传播

在已知的植物病毒中，大约有 1/7 是由其寄主植物（至少是其中的一种）的种子传播的。种子传播为病毒早期侵入作物提供了一种非常有效的方式，通过种植进行初侵染传播。因此，当某种其他方式可使病毒在生长着的作物植株间传播时，种子传播可能具有相当大的经济重要性。病毒可以在种子内保留相当长的时间，因此就可能会在商业引种时发生种子携带病毒长距离移动的情况。

表 12.1 列出了可以通过种传的不同组群的病毒和类病毒的大致传播率。

表 12.1　种子传播对不同病毒组群的相对重要性

病毒组（属）	成员数		潜在损害类型[a]						种传百分率[b]/%
	组中包含的病毒数	种子传播的病毒数	A	B	C	D	E	F	
苜蓿花叶病毒属（*Alfamovirus*）	1	1	+	+	+				1～23
雀麦花叶病毒属（*Bymovirus*）	6	1	+	+	+				+
发样病毒属（*Capillovirus*）	4	1							1～60
香石竹潜隐病毒属（*Carlavirus*）	60	2							2～90
香石竹斑驳病毒属（*Carmovirus*）	18	2							10～40
花椰菜花叶病毒属（*Caulimovirus*）	34	1[c]							≤100
长线病毒属（*Closterovirus*）	28	1							+
豇豆花叶病毒属（*Comovirus*）	15	6	+	+	+				1～90
隐潜病毒组（Cryptovirus）	31	31							100
黄瓜花叶病毒属（*Cucumovirus*）	3	3	+	+	+				<1～1
香石竹病毒属（*Dianthovirus*）	5	0							
耳突花叶病毒属（*Enamovirus*）	1	1							1～2
蚕豆病毒属（*Fabavirus*）	4	0							
双生病毒组（Geminivirus）	102	1							+
大麦病毒属（*Hordeivirus*）	4	1	+	+	+		+		+
等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）	17	8				+			1～90
黄症病毒属（*Luteovirus*）	7	0							

续表

病毒组（属）	成员数		潜在损害类型[a]						种传百分率[b]/%
	组中包含的病毒数	种子传播的病毒数	A	B	C	D	E	F	
玉米细条病毒属（*Marafivirus*）	3	0							
线虫传多面体病毒属（*Nepovirus*）	40	17	+	+	+				3～100
植物呼肠(孤)病毒组（Plant reovirus）	14	0							
马铃薯X病毒属（*Potexvirus*）	36	4							1～6
马铃薯Y病毒属（*Potyvirus*）	179	16	+	+	+	+	+	+	<1～80
植物弹状病毒组（Plant rhabdovirus）	15	1							+
南方菜豆花叶病毒属（*Sobemovirus*）	14	4							1～80
纤细病毒属（*Tenuivirus*）	11	0							
烟草花叶病毒属（*Tobamovirus*）	17	7	+	+	+				1～20[d]
烟草脆裂病毒属（*Tobravirus*）	3	3	+	+	+				1～35
番茄斑萎病毒属（*Tospovirus*）	13	1							≤95
番茄丛矮病毒属（*Tombusvirus*）	13	1							+
芜菁黄花叶病毒属（*Tymovirus*）	23	3							+
类病毒（viroids）	15	5			+	+			+

承蒙惠允，数据引自 Stace-Smith 和 Hamilton（1988），以及 AAB 出版的《植物病毒志》（*Descriptions of Plant Viruses*）（参见附录3）；注意并非这些病毒组群的所有成员都经过了种传测试。

注：a. A 表示接种体的存活；B 表示接种体扩散；C 表示主要接种体源；D 表示种质系的污染；E 表示不含病毒的植物材料的污染；F 表示从受侵染种子长成植株的直接作物损失。

b. 符号“+”表明没有相应的百分率（%）值；

c. BSV、PVCV 和 TVCV 在其各自的寄主中是明显种传的，但可能是由于激活了整合于寄主基因组的病毒序列。

d. TMV 的种传可能是由于污染造成的。

种子传播分两种基本类型。就番茄中的 TMV 而言，种传主要是通过机械方式对种苗的污染造成的。烟草花叶病毒属的其他成员也能够以这种方式传播。种子表面的病毒很容易通过一定的方式处理而受到抑制，借此可以完全或几乎完全消除种传侵染。但是仍有一定（一般较小）比例的种子的胚乳可受到病毒的侵染，并且病毒可在胚乳中存活多年。在番茄（Broadbent，1965c；Lartey *et al.*，1997）和拟南芥（Filho and Sherwood，2000）的种胚中未发现 TMV 。MNSV 的种传是由真菌介体黄瓜油壶菌（*Olpidium bornovanus*）协助的（Campbell *et al.*，1996）。

第二种是更普遍的一种种传方式，病毒存在于胚组织中。发育着的胚既可以在受精之前由受侵染的配子引起侵染（间接的胚侵染或配子传播），也可以在受精后直接受到侵染（Johansen *et al.*，1994；Maule and Wang，1996）。许多病毒以这两种方式使种子受到侵染。

某些侵染可以引起种子的病毒病症状（参见第3章），但是表现症状的种子和传播病毒的种子之间并没有必然的相关性。已经发现较小的种子传播豌豆种传花叶病毒

（PSbMV）的比例比较大的种子更高（Khetarpal *et al.*，1988）。

1. 影响受侵染种子比例的因素

a. 病毒

受侵染植物的种子被侵染的比例因病毒而异，变化非常大（表 12.1）。像大豆上的 TRSV（Athow and Bancroft，1959）及芹菜中的 SLRSV（Walkey and Whittingham-Jones，1970）对种子的侵染率都能达 100%。相反，马铃薯中 APLV 的传播率只有 1%（Jones and Fribourg，1977），被 LMV 侵染的莴苣上只有 3%～15%的种子生长成受侵染的植株（Couch，1955）。

b. 病毒决定子

不同的种传病毒分离物在同一寄主上的种传率可能不同，这表明种传具有株系专化性（Bennet，1969；Shepherd，1972；Frosheiser，1974；Adams and Kuhn，1977；Hanada and Harrison，1977；Hampton and Francki，1992）。这就使我们可以通过对分段的病毒基因组片段进行重配或假重组，或者通过序列比较和基因突变或形成嵌合体病毒这样的分子技术研究病毒的决定子。这些实验表明种传的决定子是相当复杂的。

用线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）的两个 RNA 分子进行假重组实验发现，病毒在繁缕（*Stellaria media*）上的种传明显地依赖于 RNA 1 携带的一些病毒功能。RNA 2 具有额外的但相当小的影响（Hanada and Harrison，1977）。用 PEBV 做的相似的实验也表明，在决定种子传播特性方面，RNA 1 是主要的决定子，RNA 2 或其产物只起相当小的作用（Wang *et al.*，1997a）。从 RNA 1 中去除 12 kDa 蛋白质的基因后，几乎完全消除了其种传活性。12 kDa 的缺失突变体在花药和心皮中含量很少，在花粉粒和胚珠中检测不到，表明该基因涉及配子细胞的侵染（Wang *et al.*，1997a）。

将 BSMV 的两个株系 ND18（种传）和 CV17（非种传）进行假重组实验，证明 RNAγ 对该病毒的种传发挥主要作用；RNAβ 发挥更微妙的作用（Edwards，1995）。在 RNAγ 中主要的种传决定子是 5′非翻译前导区以及在 γa 基因和 γb 基因中 369 nt 的重复区。RNAγ 的前导区、γb 基因以及 RNAα 和 RNAβ 之间有复杂的互作关系。这些结果说明 BSMV 的复制和移动在种传中起着关键作用。

用 PSbMV 的分离物 DPD-1（种传效率高）和 NY（种传效率低）构建杂种病毒，发现基因组的 5′非翻译区、HC-Pro 和 CP 编码区域均影响种传，其中 HC-Pro 起主要作用（Johansen *et al.*，1996）。对于 BSMV，这些区域对病毒的复制和移动非常重要。

c. 寄主植物

一些病毒可被范围很广的寄主植物的种子传播。例如，实验发现 6 个科的所有 9 种供试植物种子都能传播 TBRV（Lister，1960）。一些病毒在不同寄主上的传播率不同。例如，AMV 在小花草木樨（*Melilotus indica*）上的种传率是 10%，在田野水苏（*Stachys arvensis*）上是 2%，在小蛇麻三叶草（*Ornithopus compressus*）上是 0.1%（McKirdy and Jones，1994）。其他病毒在一种寄主上可以种传，而在另一寄主上则不能。因此，菟丝子潜隐花叶病毒（*Dodder latent mosaic virus*）可以由菟丝子（*Cuscuta campestris*）的种子传播，种传率为 5%，但是硬皮甜瓜（cantaloupe）、荞麦（buckwheat）和美洲商陆（pokeweed）的种子都不能传毒。

相同寄主植物的不同品种对某一特定病毒的种传率变化通常也很大。例如，莴苣品种 Cheshunt Early Giant 的种子看来不能传播 LMV（Couch，1955）。Grogan 和 Bardin（1950）发现 LMV 在其他莴苣品种上种传率的变化在 1%～8%。据报道，BSMV 在不同的大麦品种上的种传率为 0～75%（Carroll and Chapman，1970）。一个品种的不同植株间的种传率也有差异。

d. 植物受侵染的时间

对于从母体植物受到侵染的胚而言，植物受侵染的时间越早，传毒的种子所占的比率越高（Owusu *et al.*，1968；Ren *et al.*，1997）。有一个例外是大麦中的 BSMV，随着侵染时间的推移，受侵染种子的比例稳定增加，大约在抽穗（heading）前十天达到最高。过了这个时间后比例下降（Eslick and Afanasiev，1955）。

Crowley（1959）研究了与接种时间相关的开花时间对受 SBMV 侵染的菜豆种子比例的影响。该菜豆植株开花时会发生自花授粉，Crowley 记录了该事件的发生时间与接种时间的关系。在种胚完全成熟之前就将其从种子中取出，用于研究其侵染性。病毒通过侵染配子体和胚本身，都能导致对胚的侵染，但侵染只能发生在胚发育的早期阶段（直至大约受精后 4 天）。Crowley 还发现大豆上的 TRSV 和大麦上的 BSMV 也有类似的时间限制。

通过花粉形成的对胚的间接侵染显然发生在授粉期。

e. 种子在植株上的位置

被侵染和未被侵染的种子在植株上的分布没有一致的模式。Athow 和 Laviolette（1962）发现种子在豆荚中的位置以及豆荚在植株上的位置并未影响大豆种子受 TRSV 侵染的比例。在这些实验中，植株已经受到了很长时间的侵染。就已连续结籽粒一段时间的植株而言，若在接近开花或开花期受到病毒侵染，较老的种子受侵染的比例要比幼嫩种子小。

对于 SMV 而言，杂色（斑驳）种子与非杂色种子在种子传播率上没有差异（Pacumbaba，1995）。

f. 种子的储藏期

一些病毒在储存的种子上很快丧失活性，而另一些病毒则能存活多年。Fulton（1964）曾描述过带有樱桃坏死环斑病毒的红樱桃（*Prunus pennsylvanica*）种子上病毒活力的丧失。在最初 4 年里，2℃储存，带毒种子的比例相当稳定，保持在 60%～70%。在第 6 年，只有不到 5%的种子仍然带毒，而种子的（萌发）活性的降低则不明显。受 AMV 侵染的苜蓿种子在 －18℃或室温储存 5 年后，病毒的活力几乎没有降低（Frosheiser，1974）。

g. 高温

充分干燥的种子相对于植物的其他部分耐高温的能力较强。一些种传病毒对高温的耐受力与它们所侵染的种子的耐受力相当。在 16～32℃，TRSV 在大豆种子中可以存活 5 年，与在 1～2℃ 的条件一样，然而在较高温度下储存，种子的发芽率下降明显（Laviolette and Athow，1971）。种子中的病毒具有这种抗性的原因现在还不清楚。可能是由于低含水量和高蛋白质含量对完整病毒粒体有稳定作用。

h. 寄主的抗性

尽管有几个例子说明种子传播病毒的能力因品种而异，但有关特性的遗传方面的研究很少。在大麦中，有一个隐性基因调控大麦对 BSMV 的种传的抗性（Carroll *et al.*，1979）。但是，正如 Maule 和 Wang（1996）所指出的，这项研究并没有评估抗性产生是由于影响了配子传毒还是胚的直接侵染，或者这两种机制均起作用。PSbMV 的种传是对胚的直接侵入引起的，由于通过异花传粉引入后代的对种传潜在的抗性或感病性对最终的种传效率没有影响，因此它是由母本的组织而不是由子代决定的（Wang and Maule，1994）。在豌豆中涉及该病毒种传的性状为不完全显性，并且在 F_2 代中发生分离，因此这些性状可能只涉及很少的基因。

尽管尚未鉴定出控制种传特性的寄主基因，但已对基因产物的特性做了各种预测（Maule and Wang，1996）。这些基因式因子包括：①与侵染分生组织的能力有关的控制侵染配子能力的基因（如分布于寄主植物全株的隐潜病毒能够很有效地得到种传）（Kassanis *et al.*，1978）；②在病毒存在时，控制配子和胚存活的基因；③控制病毒增殖和移动的寄主因子；④涉及胚成熟、影响病毒的存活时间的寄主因子。

很明显，控制种子传播因子的遗传学是很复杂的。它们一定与胚获得病毒的机制有关，并且可能因病毒-寄主组合而异。

2. 病毒在种子内的分布

种子的表面或种皮带毒引起的病毒传播是很少见的，也只是一些很稳定的病毒如 TMV 才存在这种情况（Johansen *et al.*，1994）。因此，多数种传是由于胚受到侵染才发生的（Johansen *et al.*，1994）。

3. 种子传播的机制

胚受侵染可以通过两种途径，即直接来自于母体植物或通过花粉（Johansen *et al.*，1994；Maule and Wang，1996）。来自于母体植物的直接途径会引起问题，因为在减数分裂时与共质体的连结会被切断。不管哪一种途径，引起胚侵染的途径都是复杂的，并且涉及一系列遗传和环境的互作（Maule，2000）。若要侵染胚，病毒需要到达花的分生组织或者是胚本身。到达花的分生组织就避开了在韧皮部里对正常的长距离移动的限制（第 9 章）。应用原位杂交和免疫组织化学技术，Wang 和 Maule（1997）比较了在豌豆胚中 PEBV 和 PSbMV 随时间和空间的积累，并区别了两种侵染途径。

（1）配子的侵染。一些病毒，如 PEBV、线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）和隐潜病毒（cryptic viruses），可以侵染花的分生组织，因此可侵染配子体（图 12.7）。其机制的具体细节尚不清楚。

（2）胚的直接侵染。对 PSbMV 的该侵染途径已经有了详细研究（Wang and Maule，1994）。受精后，病毒移动穿过未成熟种子的外种皮（testa），并且必须到达种子的珠孔区（micropylar region）才能侵染胚。珠孔（micropyle）与胚柄（embryonic suspensor）基部密切接触，胚柄的功能是作为营养流的通道支持胚的生长。胚柄是病毒侵染胚本身的必经途径（图 12.8），但它在种子的发育过程中会降解。这就为病毒侵染胚芽提供了一个时段。但是，母体组织和胚组织间没有共质体连接，病毒如何从母体

的外种皮细胞进入胚柄尚不清楚。

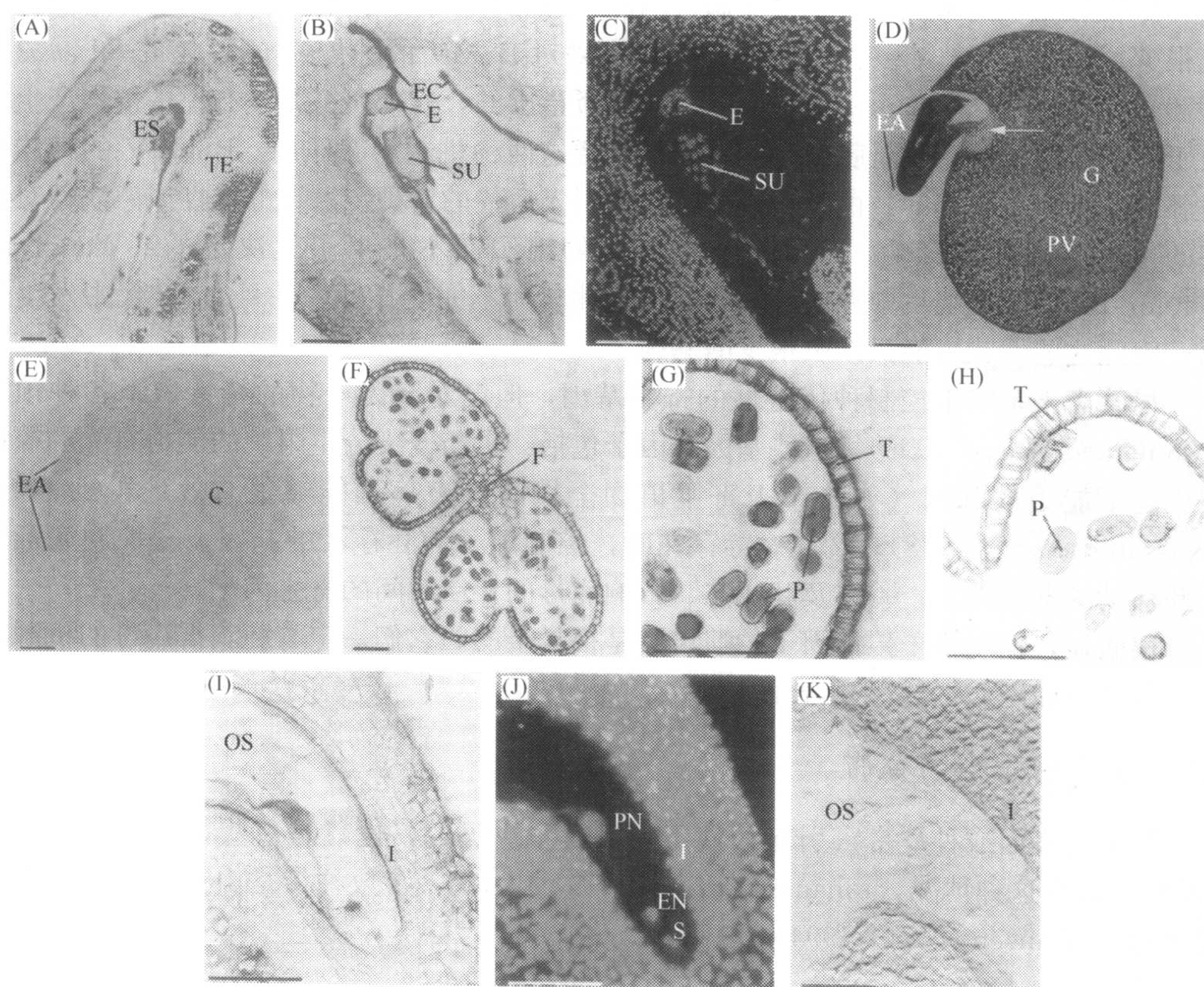


图 12.7 （见彩色图版 12.1）在豌豆的胚和配子中检测 PEBV。为了阐明 PEBV 在组织中的分布，将未成熟种子[(A)～(C)]，分离的胚[(D)、(E)]，花药[(F)～(H)]，受精卵[(I)～(K)]的切片用固红（fast red）TR 作为显色底物进行免疫组织化学检测[(A)～(C)，(F)～(K)]，或者用 BCIP/NBT 作为底物进行原位杂交[(D)、(E)]。就未成熟的种子而言，PEBV[(A)、(B)]在外种皮（TE）、球状胚（E）以及多核胚柄（SU）中的定位可以通过 DAPI 染色来表明[(C)]。从受侵染[(D)]和未侵染[(E)]的植株中获得的第 5 阶段的胚的切片用地高辛（DIG）标记的 RNA 探针来检测 PEBV 的正链 RNA。病毒 RNA 均匀地分布于整个胚，箭头所指的胚轴和子叶的交界处除外。花药横（切面）切片用 PEBV 的抗血清[(F)、(G)]或免疫前血清[(H)]进行免疫染色。PEBV 存在于花药丝（anther filament）(F)、绒毯层（T）以及成熟花粉粒（P）的维管束组织中。未授粉的受精卵的纵切片用 PEBV 抗血清[(I)、(J)]或免疫前血清[(K)]进行免疫染色。相对于助细胞（synergid）（S）、极细胞（PN）和卵细胞（EN）的位置，PEBV 在珠被（integument）(I) 和胚珠囊（OS）中的积累通过将相同切片用 DAPI 染色来指示[(J)]。C，子叶；E，球状胚；EA，胚轴；EC，胚乳细胞质；EN，卵细胞核；ES，胚囊；F. 花药丝；I，珠被；OS，胚珠囊；P，花粉粒；PN，花粉核；PV，原形成层组织；S，助细胞；SU，胚柄；T，绒毯层；TE，外种皮。比例尺：(D)和(E)＝1 mm，其他 100 μm。承蒙版权所有者（© Blackwell Science Ltd.）惠允，引自 Wang 和 Maule（1997）。

对豌豆品种 Vedette（种传率为 60%～80%）和 Progretta（种传率为零）中 PsbMV 的时间和空间分布进行的比较研究表明，在 Progretta 中，病毒的分布并未利用这个时机（Wang and Maule，1994）（图 12.8）。

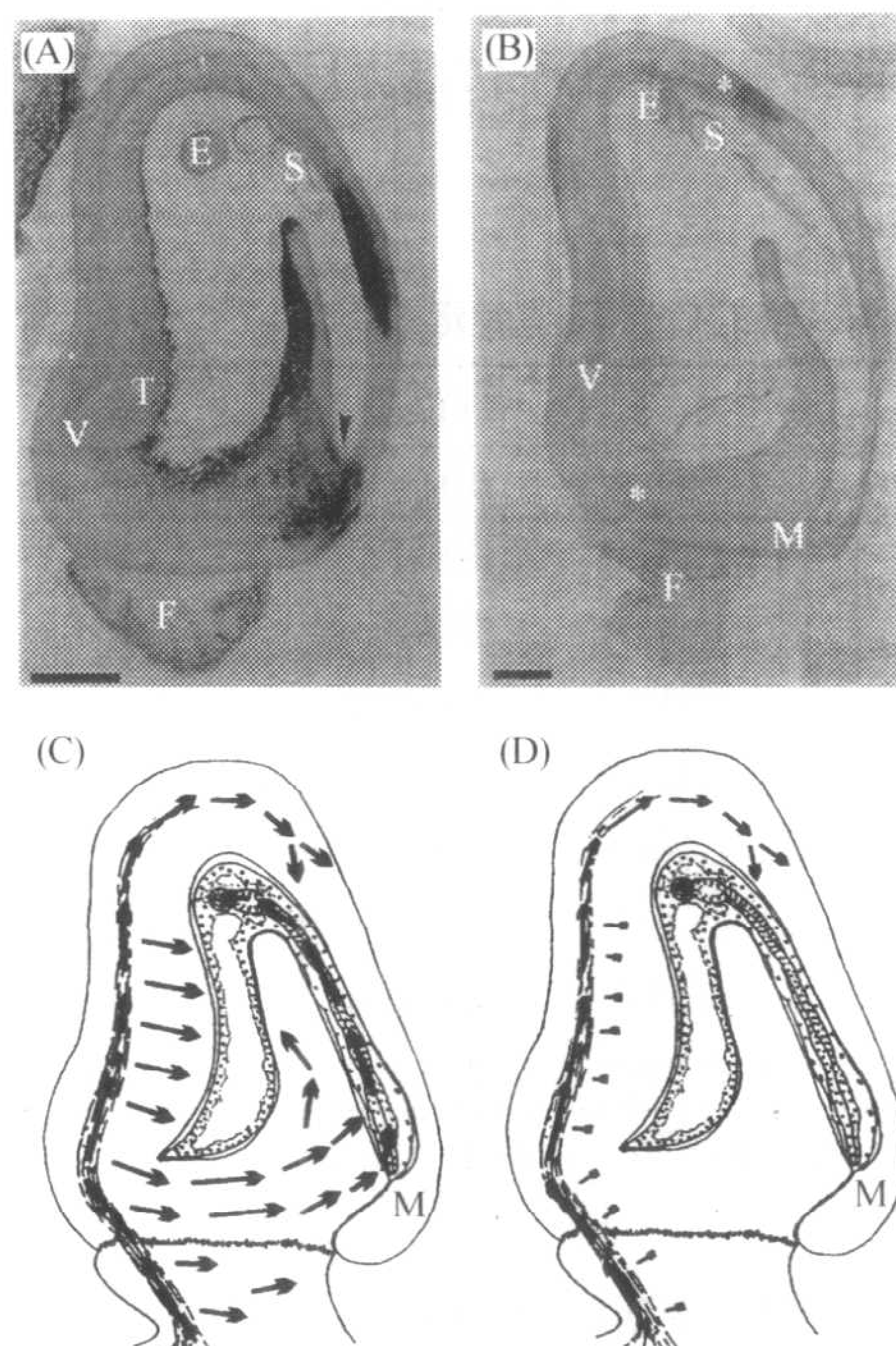


图 12.8 （见彩色图版 12.2）豌豆种子传播的 PSbMV 途径。（A）和（B）用针对 PSbMV 外壳蛋白的单克隆抗体对 PSbMV 在未成熟的豌豆种子纵切片中的分布进行免疫组织化学分析。结果表明品种与病毒间的许可性互作［如（A）豌豆品种 Vedette］导致了病毒在外种皮组织中的广泛积累。与此相反，在非许可性互作的情况下［如（B）中豌豆品种 Progretta］，病毒通过维管束进入种子，但是不能大量侵入邻近的外种皮组织。在这两种情况下，侵染后病毒的积累水平都会逐渐下降，以至于就品种 Progretta 而言，只有在（星号所指的）部分侵染组织中才能检测到。对不同阶段的未成熟的种子的系统性分析已经阐明了病毒侵染两个栽培品种［在（C）和（D）中的示意图分别代表品种 Vedette 和 Progretta］时的路径（红箭头）。所有这些研究得出的最为一致的结果是病毒必须到达外种皮的珠孔区（micropylar region）才能进行种传，该区域提供了外种皮组织和胚柄间最紧密的接触点［（A）中的箭头］，在非许可性互作的情况下，病毒在外种皮的非维管束组织中的移动和（或）复制受到了阻止（用红色正方形标出）。E，胚（embryo proper）；F，珠柄（funiculus）；M，珠孔区；S，胚柄；T，外种皮；V，维管束。比例尺：在（A）和（B）中均为 500 μm；承蒙版权所有者（© Elsevier Science）惠允，引自 Wang 和 Maule（1996）。

4. 通过受侵染的花粉进行传播

一些病毒通过花粉在植株间传播（表 12.2）。AMV 通过花粉传播比通过胚珠传播更有效（Frosheiser，1974）。相反，莴苣上的 LMV 通过胚珠传播产生的受侵染的种子的百分率为 5%，仅比通过花粉传播低 0.5%（Ryder，1964）。相对于只有一个配子来自受侵染的个体，受侵染植物的自花授粉可能引起更高的种子带毒率。健康的和受侵染的拟南芥个体的杂交结果表明，TYMV 可以侵染来自于母本以及父本的种子，但对于

TMV来说，母本组织受侵染是病毒侵染种子的唯一途径（Gilho and Sherwood，2000）。至于种传，两种传播机制在花粉传播、胚的配子侵染，以及母体植物的直接侵染中似乎都起作用。

表 12.2 通过花粉传播给其他植物的病毒和类病毒

病毒属	病毒	植物	类病毒	植物
等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）	BlShV	蓝莓	ASSVd	苹果
	PDV	核果	ASBVd	鳄梨
	PNRSV	核果	CSVd	菊花、番茄
	TSV	多种植物	CEVd	柑橘、番茄
线虫传多面体病毒属（*Nepovirus*）	AYRSV	洋蓟	CCCVd	椰子
	BLMoV	蓝莓	CbVd-1	锦紫苏
	CLRV	胡桃、桦木	GYSVd-1	葡萄
南方菜豆花叶病毒属（*Sobemovirus*）	SoMV	藜属植物	HSVd	黄瓜、葡萄、啤酒花、番茄[a]
悬钩子病毒属（*Idaeovirus*）	RBDV	悬钩子	PSTVd	马铃薯、番茄

注：a. 依赖于类病毒的株系。承蒙惠允，引自 Mink（1993）。

通过电子显微镜在受侵染的花粉粒中观察到了 BSMV（Carroll，1974）和 TRSV 的病毒粒体（Yang and Hamilton，1974）；通过 RT-PCR、点印迹（dot blot）和原位杂交（*in situ* hybridization）也能检测到花粉粒中的 PNRSV（Aparico *et al.*，1999）。在精细胞（sperm cell）的细胞质和细胞核中都能观察到 BSMV 的病毒粒体，在与胚胎发生相关的细胞和组织中也有广泛的分布（Brlansky *et al.*，1986）。在另一项研究中，免疫金标记发现 AMV 病毒粒体在苜蓿的胚珠、花粉和花药中都有广泛分布（Pesic *et al.*，1988）。对于这些病毒而言，卵细胞受侵染可能是通过受侵染的精子，或只通过精核（sperm nucleus）。另一方面，PNRSV 只在营养细胞（vegetative cell）的细胞质中存在，而生殖细胞（generative cell）中则没有，这就说明胚的侵染不是由精细胞引起的。已经发现受侵染植物成熟花粉粒的外壁（exine）带有数种病毒，如 TMV，且浓度很高。这些现象均指向了花粉传播的第二种机制。从受侵染的花粉粒上萌发的芽管可能携带病毒粒体，或者实际上已通过机械方式受到侵染，并将有活性的病毒带进胚珠中。隐潜病毒（cryptoviruses）的情况有所不同，因为它们可通过花粉和种子高效传播，但不能通过机械方式、嫁接和无脊椎介体传播（Lisa *et al.*，1986）。因此，可以认为病毒侵染花粉的能力与侵染分生组织的能力有关（Maule and Wang，1996）。

在某些情况下，母本植物自身也会受到侵染。Gilmer（1965）报道了酸樱桃黄化病毒可以通过花粉在树与树之间传播。花粉可以由人、风或蜜蜂携带（Converse and Lister，1969）。在田间的自然传播可能是通过受侵染的花粉而非其他方式，正如由 Murant 等（1974）发现的悬钩子上 RBDV 的情况一样。Francki 和 Miles（1985）发现对粘有从受 SoMV 侵染的植物上落下的花粉的叶片，加以机械摩擦即可发生病毒的传播。然而，据报道烟蓟马和其他几种蓟马也可能参与了几种病毒的花粉传播（Hardy and Teakle，1992；Sdoodee and Teakle，1993；Klose *et al.*，1996）。Sdoodee 和 Teakle（1993）表明 TSV 侵染的花粉可以由蓟马在体外和体内携带，可能通过取食损伤而侵染

植物。

受病毒侵染的花粉在何种程度上作为影响病毒在田间传播的一个显著因素，目前尚未完全确定。这一点对异花传粉的多年生木本植物比对一年生作物在经济上的影响更大。对某些病毒而言，受侵染的花粉对健康植株进行传粉时可能仅导致新生的种子被侵染。

B. 通过营养繁殖进行传播

营养繁殖是一项重要的园艺措施，但不幸的是，它同时也是保存和传播病毒的一种有效方式。经济上重要的病毒能够在植物的大部分繁殖材料上进行系统性侵染。植物一旦被病毒系统性侵染通常会终生带毒。因此，任何用于繁殖的营养部分，如块茎、鳞茎、球茎、长匐茎（runner）和插穗（cutting），通常都会受到侵染。在许多情况下，某一特定供试栽培品种的每一植株都被某特定病毒侵染，如一些马铃薯品种受到 PVX 的侵染。但是，当用于繁殖的某种植物的一个健康植株受到侵染后，即使在生长的很早期阶段，在第一个生长季节病毒也未必能系统移动至整个植株。

C. 通过嫁接传播

嫁接（grafting）本质上是无性繁殖的一种方式，即一个植株的一部分在另一植株的根上生长。一旦形成这种器官的接合部（organic union），砧木（stock）和接穗（scion）就变成了一个植株。一旦砧木或取接穗的个体受到了一种病毒的系统性侵染，如果这两部分都感病，则嫁接的植株作为一个整体将会受到侵染。前面对嫁接传播的描述请参见第 1 章。在早期对植物病毒的研究中，若证明一种病害可通过嫁接传播，并且用光学显微镜观察不到病原物，就认为该病害是由病毒引起的。一些曾被认为只能通过嫁接传播的某些病毒，现在知道它们也可以通过其他方式传播。

关于嫁接的过程可参见 Dijkstra 和 de Jager（1998）主编的专著。

嫁接传播可能会引起不同于其他传播方式如机械接种的另一种病状。例如，将 TMV 机械接种于心叶烟后，通常由于病毒不能系统移动而出现局部坏死症状。但是，用 TMV 系统侵染的烟草嫁接到健康植株上，则该植株就会死于系统性的坏死症，这可能是由于病毒侵入了该过敏性寄主的维管组织（Zaitlin，1962）。

不能用其他方式传播的病毒通过嫁接可能会得到有效的传播。然而，嫁接并不总是一种有效的方式。有时可能是由于提供接穗的被认为发病的植株未受到完全的系统性侵染。若被嫁接的健康植物材料的组织对病毒有局部坏死反应，病害的传播可能就无法完成。例如，Chamberlain 等（1951）发现当把取自 Burbank 和 Sultan 李树的健康芽嫁接到镶脉(带)型的李花叶病害侵染的李砧木上，芽的反应就是发生坏死以至死亡。这或许就是这些品种在田间很少被发现有病毒侵染的原因。在正常条件下，不同病毒嫁接后在不同的最短时间内传播。Fridlund（1967b）研究了侵染李属植物的 12 种病毒，发现导致 100%传播的最短芽接触时间为 74～152 h。独立嫁接株的形成（unaided graft formation）是不常见的，因此这种病毒传播方式在自然界中没有太大的作用。然而，在根之间可存活的接合（viable union）对于病毒的传播可能有重要意义，对某些多年生寄主而言尤其如此。

D. 菟丝子传播

菟丝子（*Cuscuta* spp.）（旋花科）是在高等植物上寄生的攀援植物。许多不同的菟丝子种具有相应不同的寄主范围，其中一些种的寄主范围很广。Bennett（1940b）证明菟丝子可以在植物间传播病毒。菟丝子形成的吸器（haustoria）与寄主的维管束组织相连。病毒或许就是通过胞间连丝进行传播的，胞间连丝可以暂时连接菟丝子的吸器末端和寄主细胞的原生质体。

菟丝子传播在某些方面与嫁接类似。但是，嫁接只局限于非常相近的植物——通常是一个属内的植物。而菟丝子可以用于病毒在远缘植物间的传播（Desjardins *et al.*，1969）。进行实验性传播的病毒可能不在菟丝子体内增殖，菟丝子只作为连接两株植物的通道。在某些条件（如修剪菟丝子并用菟丝子遮蔽健康植物）下，TMV 的传播能显著地增加，人们认为这些条件能使营养成分通过菟丝子从感病植物流向健康植物（Cochran，1946）。Bennett（1940b）能将 CMV 和 TMV 分开，就是因为当菟丝子在对两种病毒均免疫的寄主上生长时，CMV 仍保留在菟丝子中，而 TMV 被丢掉。

用于研究传播的菟丝子有时可能就隐藏着某种未预料到的病毒。因此，Bennett（1944）发现不表现症状的加州菟丝子（*Cuscuta californica*）通常会受到一种病毒的侵染，他称之为菟丝子潜隐花叶病毒（Dodder latent mosaic virus），可在几种不相关植物上引起严重病害。

菟丝子传播的主要实验用途之一就是将病毒从不易研究的寄主上转移到有用的实验植物上。对于田间有经济重要性的病毒的传播，菟丝子或许是不重要的影响因子，因此近来很少用于实验研究。

E. 总结和讨论

种子传播在一些病毒的流行学上非常重要，特别是一些与相对不活跃的介体如线虫相关的病毒。如下面第Ⅳ节 A.2 部分所述，几种由线虫传播的病毒可以在一年生杂草上由种子传播，为病毒提供了一种较远距离的传播方式。对于一些蚜传病毒如 LMV 和 SMV 而言，种传可以提供初侵染源，因而也非常重要。

只有部分病毒可通过种子传播，并且通常仅在某些特定寄主上才能种传。在第Ⅲ节 A.3 部分描述的 Maule 及其同事的工作，增进了我们对限制病毒侵入胚的一些因子的理解。其他的因子可能包括病毒系统侵染的速率和路径，以及病毒与寄主普通防御系统的互作。

第Ⅳ节 生态学和流行学

为了生存，植物病毒必须有：①一种或多种可供其增殖的寄主植物；②一种有效的方法传播到新的植物个体并加以侵染；③足够多且适合其侵染的健康寄主植物。在一个特定地点或全球范围内的任何一种病毒，它的实际存在状况都是多种物理因子和生物因子之间复杂相互作用的结果，其中主要的一些因子如图 12.9 所示。

在本节中，将简要地讨论其中比较重要的一些因子，并说明它们影响植物病毒生存

和分布的相互作用方式。理解一种病毒在特定作物和地点的生态学和流行学，对建立合适的方法以控制其引起的病害是必要的。与大多数其他专性寄生物一样，需要考虑的主要生态因素通常是病毒在植物间传播的方式和其他因子影响这种传播的方式。Maramorosch 和 Harris (1981) 已讨论过生态学和流行学方面，其他人（如 Irwin and Thresh, 1990; Wisler *et al.*, 1998; Robert and Lemaire, 1999; Robert, 1999; Dewar and Smith, 1999; Lecoq, 1999; Burgess *et al.*, 1999）也分别对特定病毒组群（科或属）进行了研究；针对特定病毒提出来的观点也适用于其他许多病毒的情况。

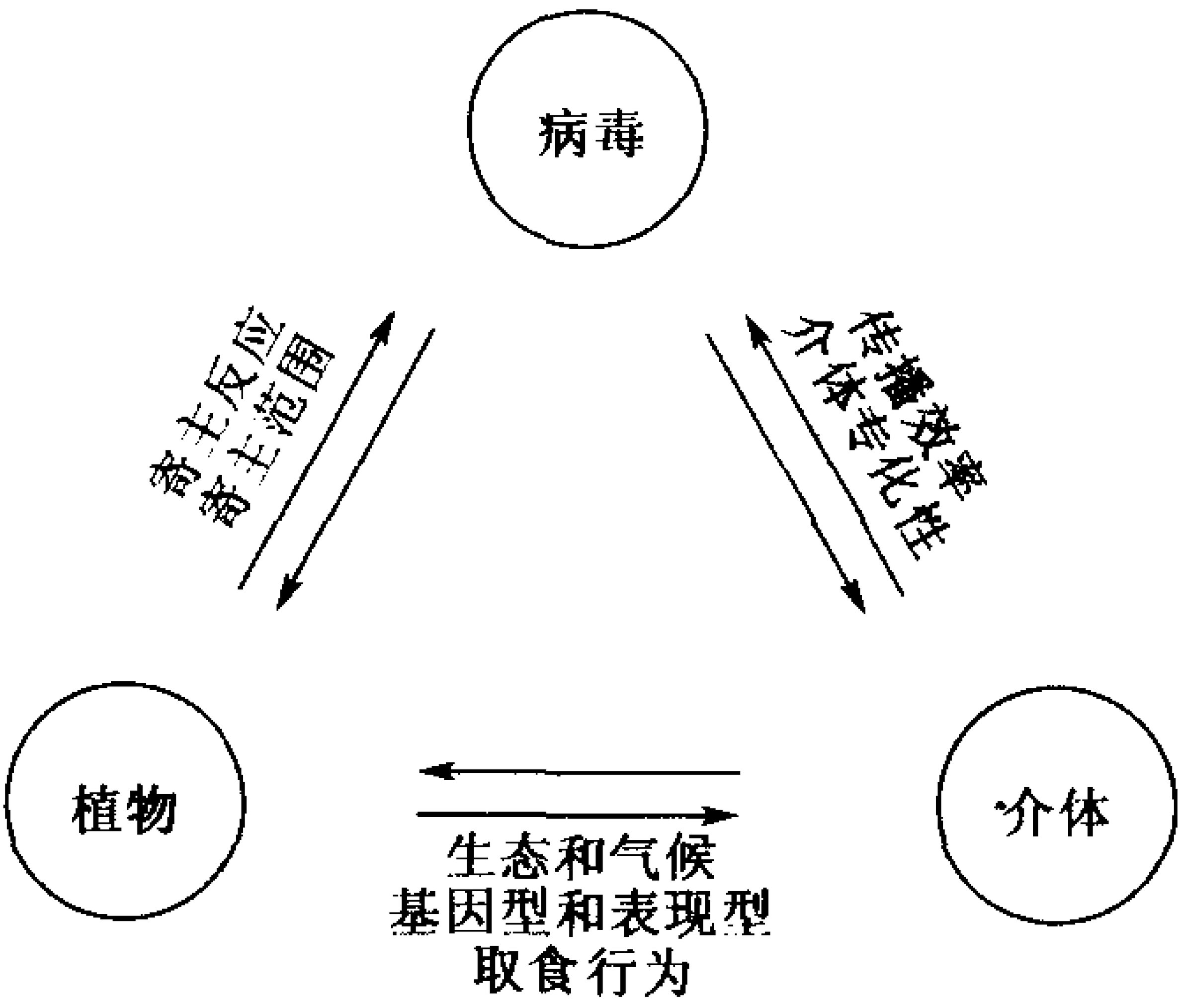


图 12.9 在植物受到病毒自然侵染的情况下所涉及的一些互作。经允许引自 Hull (1991b)。

我们应该区别使用流行学（epidemiology）和生态学（ecology）这两个术语，因为在许多论文中它们一直被不加区别地使用。生态学描述在特定的物理条件下影响一种病毒行为的因素。这些因素包括寄主范围、组织向性（tissue tropism）、发病机制（pathogenesis）和寄主反应。它是基于病毒的相关特性的基本概念，而不是环境的一个特性。流行学是研究寄主种群中病毒病害的决定因素（决定子，determinant）、动力学和分布的学科。它包括决定一种病毒传入特定场所的各种因子的维度方面（dimensional aspect）。这两个术语经常是相互联系的，但是各自有其特定的含义。在本节中，将对二者一起加以讨论。

A. 生物因子

1. 病毒及其寄主植物的特性

a. 病毒的物理稳定性和所达到的浓度

就机械传播的病毒而言，在植物体内外都稳定以及在组织内达到高浓度的病毒比高度不稳定的病毒更有可能存活和传播。某些病毒的存活和传播可能主要取决于其高度的稳定性和在侵染组织中的大量积累。例如，TMV 可以在土壤中的植物残体中长期存活，并成为下季作物的侵染源（Johnson and Ogden, 1929）。Wetter 和 Bernard (1977) 发现德国 42 个品牌香烟中的 TMV 均有侵染活性；该病毒的产量为 0.1～0.3mg/g 烟草。香烟中 TMV 的比侵染性（specific infectivity）大约是从新鲜叶片中分离的 TMV 的一半。

病毒在某个季节保持高浓度可能很重要。繁缕是 CMV 的越冬杂草寄主。Walkey 和 Cooper (1976) 发现低温时 CMV 在该寄主内的浓度达到最高。因此，这种植物将会成为蚜虫在春季获取病毒的良好毒源。

b. 在寄主植物内的移动速度和分布

在寄主内从侵染点移动慢的病毒（或株系）与移动快的相比不易存活及有效扩散。

就寄主个体寿命的测定而言，移动速度是相当重要的。侵染多年生灌木或树木的病毒与影响一年生植物的病毒相比，在寄主内的移动可以慢许多。能够进入种子内部并存活的病毒在传播和存活方面有明显优势。TNV 在大多数寄主内都局限于根部，在自然条件下它借助真菌介体通过土壤传播以侵染新的寄主。

c. 病害的严重度

与仅仅引起微弱或者中度病害从而允许寄主存活并有效增殖的病毒相比，如果一种病毒能迅速引发系统病害而杀死寄主植物，就不易存活下去。田间可能对引起寄主植物快速死亡的株系存在自然选择。如第 17 章所述，病毒可能同它们的自然寄主存在着协同进化，许多作物病害严重可能是因为还没有足够的时间使它们之间进化形成稳定的关系。生活在美国西部沙漠植物上的叶蝉主要传染在甜菜上引起微弱症状的 BCTV 株系。强毒株系在一代叶蝉成熟之前就将某些种类的沙漠植物杀死，因此，沙漠中的强毒株系逐渐减少（Bennett，1963）。

然而，病害的严重度对甜菜种植的影响非常不同。如果甜菜植株幼小并暴露于充足的光照下，将是叶蝉的良好寄主。当甜菜植株长大后导致遮荫，就不适合作叶蝉的寄主。由于这个原因，BCTV 的强株系通过产生小而矮化的植株适合介体繁殖，从而促进它们（病毒）在甜菜中的传播（Bennett，1963）。由于弱株系不能通过交互保护阻碍强株系的侵染，因而对强株系的扩散起到进一步的辅助作用。与沙漠中的叶蝉相比，在甜菜地附近越冬的叶蝉携带有较高毒性（致病力）的病毒株系。

d. 突变性和株系的选择

一种病毒能够通过突变产生有效地应对环境变化的株系的程度可能对病毒的存活和散布有重要影响。不同病毒的突变速率很难进行合理比较，但是它们的差异可能相当显著。例如，PLRV 看来相当稳定（尽管这可能仅仅反映了缺乏此病毒的实验方法和合适技术），然而许多其他病毒，如 CMV 和 TSWV 在自然界中有众多株系存在。有充足的证据表明，同一病毒的不同株系可能以不同速率进行突变并产生某种突变体类型。从马铃薯上分离的 PVX 弱株系经常在烟草上产生环斑株系，但从未观测到最初在番茄上分离的 TBR 株系有类似的现象（Matthews，1949a）。普通的 TMV 却能产生一系列的突变体类型（Bawden，1964）。

如第 17 章（第Ⅲ节）所述，已知的各种例子表明，当一种病毒的不同株系混合存在时，特定的寄主植物允许某些株系选择性地增殖。同样，无脊椎动物介体有时也表现出传播一种病毒的某些株系比传播另一些株系更有效（第 11 章）。这些实验说明了自然条件下株系选择的方式。

在田间自然条件下，不同的烟草种和品种可能被不同的 TMV 株系所侵染。导致某一株系在一种特定寄主上成为优势株系的主要因素可能是它能够系统侵染植物的速率，并因此排斥了其他株系（第 17 章）。

在一年生作物（如烟草）已经种植多年的地区，代表性株系可能会占优势。因此，Johnson 和 Valleau（1946）描述了在老的烟草种植区，TMV 的不同优势株系逐渐成为不同烟草田的代表株系。在更大的范围内，地理隔离可能逐渐导致株系的趋异分化，尤其是在气候条件不同的地区。这种优势株系类型的地理性变异并不罕见（参见第 17 章第Ⅻ节 B 部分）。

如果一个地区存在一种病毒某个株系的稳定的自然寄主群体，该株系可能会持续许多季节都在这一特定作物和地区占优势。在全年高温的地区，各种病毒株系可能已适应在这种温度下生存。然而，在夏季温度非常高的地区，病毒可能会在体内失活。例如，在加利福尼亚帝国河谷（Imperial Valley）生长的草莓上，SCV 被从受侵染植株中清除（Frazier *et al.*，1965）。在法国东南部，CMV 的两个株系在番茄和辣椒植株上占优势的时间表明，季节看来是一个因素。一个热敏株系（thermosensitive strain）在春季占优势，而抗热株系（thermoresistant strain）则在夏季流行（Quiot *et al.*，1979a）。BYDV 相关的各种病毒（以前被认为是株系）可以由病害严重度和传播它们的蚜虫种类来区分。在 20 多年间纽约州的优势株系已经发生变化，由介体特异的 MAV 型分离物逐渐变为类似于 PAV 的株系（Rochow，1979）。相反，对于特定的作物和季节，在大范围内可能检测不到病毒的致病性变异，如大豆上的 BPMV（Ross and Butler，1985）。

农事操作可能在许多方面影响病毒株系成为某一作物上的优势株系。例如，在苏格兰培育马铃薯品种 Arran 的种植园，栽培和选苗操作过程中无意导致了几乎所有本来长势很好的秧苗在早期被 PVX 侵染，这是由于接触了已严重感染该病毒的商业品种所致。由于秧苗是通过营养繁殖方式扩繁的，将表现花叶症状的个体丢弃，导致了这个品种含有占优势的 PVX 弱株系（Matthews，1949b）。迅速致死的病毒病害的暴发可能表明寄主和病毒间出现了一种新的不稳定关系。当对不含 PVX 的马铃薯植株接种从其他不表现明显病害的品种上分离的病毒时，在感染的这一年它们不表现症状。下一年产生的病害变化非常大，甚至于同一块茎的不同芽上也有差异。有些芽被侵染后引起严重坏死和死亡，而其他的仅表现轻斑驳或者没有症状（Matthews，1949a）。一个时期的自然和人工选择毫无疑问会培育出一个仅表现轻型侵染的马铃薯品系。

在商品番茄的栽培中，利用 TMV 的一个无毒株系（由株系 1 衍生而来）提供对 ToMV 的交互保护（第 16 章第Ⅲ节 A 部分），导致感病品种上株系 1 的侵染明显增加（Fletcher and Butler，1975）。

如果一个地方多年生杂草和野生寄主中存在一年生农作物的毒源，就会发生连续多季的植物均受到此病毒各种株系的侵染，这样病毒永远不会有充分适应农作物的机会。

当农事操作或者其他因素没有带来突然变化时，我们设想对于任何特定的寄主和环境，病毒株系的选择将持续发生直至最适于存活的株系占据优势。一个株系存活的重要因素包括：①通过昆虫或其他方式进行有效传播；②与任何竞争株系相比，能够在植物体内更快速地增殖和移动；③产生轻微或者仅为中度严重的病害。Timian（1974）通过对大麦上的 BSMV 进行实验研究了这些因素。

e. 病毒的植物寄主范围

病毒在植物界的总的分布情况已在第 2 章并将在第 17 章中加以讨论。现在讨论病毒的寄主范围可能对其在田间分布的影响方式。

各种病毒能够侵染的植物种类的范围变化很大。侵染草莓的一些病毒局限于草莓属（*Fragaria*），而其他病毒也许能够侵染广范围的植物，如 CMV 可以侵染超过 85 个科的 1000 多种植物。其他寄主范围非常窄的病毒能够存活，可能是由于它们的寄主是多年生的或营养繁殖的，或者病毒能够通过种子有效传播。

多样性的寄主使一种病毒更有机会保存下来并广泛传播。以多年生观赏植物以及其他农艺和园艺种类为寄主的病毒已经在世界范围内广泛分布。观赏花卉中重要的例子有：①唐菖蒲上存在BYMV和CMV；②大丽花和其他花卉上的TSWV，许多国家的大丽花经常被该病毒侵染，成为主要毒源（大丽花也可能携带CMV，通常没有症状）；③CMV存在于百合上，通常没有症状。

杂草、野生植物、灌木栅篱和观赏性树木也可以成为保存病毒的库源。这些不同种类的寄主对于邻近作物的实际重要性取决于环境，尤其是活跃的无脊椎动物介体的存在。例如，在尼日利亚的3种锦葵科杂草中存在的OkMV可能是农作物上此病毒的一个重要来源，因为具传染性的甲虫介体表现活跃（Atiri，1984）。另一方面，尽管ACLSV存在于英国的相当比例的栅篱山楂植株上，但看来对于此病毒传播到果树上的意义不大（Sweet，1980）。杂草寄主中，车前草属（*Plantago*）植物可能是潜在的毒源。它们是生命力和适应性都很强的多年生杂草，在世界范围内广泛分布。目前已经发现至少有19个组和科的26种病毒在自然条件下能侵染车前草属植物（Hammond，1982）。EHBV和RHBV的自然寄主占据不同的生境（生态位），因此，尽管EHBV能侵染水稻，但在田间条件下不会发生（Madriz *et al.*，1998）。一种病毒的不同株系可能优先侵染特定的杂草。例如，在法国东南部，虽然CMV的耐热株系在马齿苋（*Portulaca oleracea*）中占优势，而热敏株系却在茜草（*Rubia peregrina*）中占优势（Quiot *et al.*，1979b）。Duffus（1971）论述过杂草在病毒病害发生中重要而复杂的作用。

许多线虫和它们所传播的病毒有较广的寄主范围，包括多年生木本植物。这些病毒及其介体在缺乏合适的农作物寄主时，通常在树篱和森林中的木本植物上存活。GFLV及其线虫介体标准剑线虫（*Xiphinema index*）主要局限于田间的葡萄植株上，这种情况非常罕见。既然葡萄藤可长久存活，它们就没必要为了生存去选择其他寄主。此外，在地上部的葡萄藤被砍除之后，GFLV及其线虫介体还能够在土壤中的活根上存活多年。

2. 扩散

病毒借助于气传或土栖介体、种子和花粉进行的扩散以及通过人类活动的长距离扩散在病毒的生态学和流行学中起着重要的作用。

在对多数一年生作物，偶尔也有部分多年生作物的侵染中，病毒的流行或扩散过程分为两个阶段。初侵染是由带翅介体引起的，或者是源自因种子传播而侵染的一些植物。接下来是再传播，可能通过植物间局部飞行的带翅介体进行，或者当叶片接触时由在植物间穿行的无翅介体完成。与介体存在非持久性或半持久性关系的病毒通常是通过带翅介体在寻找寄主的飞行中进行再传播的，而持久性病毒的传播则是由定殖某种植物的昆虫传播的。初侵染后的再传播经常导致作物中出现成片的受侵染植物，并且呈现以初侵染点为中心的侵染梯度（图12.10）。

a. 气传介体

就植物病毒总体而言，飞行的、吸取汁液的昆虫介体，尤其是蚜虫，是迄今为止最重要的与病毒传播和生存相关的因子。在作物中传播的类型及传播速率和范围取决于许多因素，包括：①接种体的来源——是否来自作物外部，还是作物内由于种子传播或营



图 12.10 （见彩色图版 12.3）一处甜菜地的航拍图（aerial view），成片的植株受病毒性黄症［BYV 和（或）BMYV］的侵染以及侵染从这些发病片向外扩散的梯度。承蒙 IACR 的 Broom's Barn 实验站提供照片。

养繁殖而发病的个体，是否来自杂草或作物内的其他植物，还是作物残体；②现有的潜在接种体的数量；③介体的本性和习性，就蚜虫而言，是有翅的暂时经过者还是定殖者；④病毒在介体内是非持久性、半持久性还是持久性的；⑤与作物生长期相关的介体变得活跃的时间；⑥天气状况。

在早期探讨蚜虫数目和病毒扩散的相关性的研究中，于生长季节的不同时间对植物上的实际蚜虫数目进行了计数。这些数目与病毒扩散之间的关系往往不明显。Doncaster 和 Gregory（1948）在这方面做出了贡献，他们指出了迁飞性有翅蚜，特别是在生长季节早期在作物之间移动的那些蚜虫的重要性。在植物个体上建立的静态种群的大小很大程度上取决于当地的天气和作物内部的其他条件。种群可能会以非常快的速率增加（7 天内大约 10 倍），甚至一种作物内部的一个小区域里种群密度也可能变化非常大。后续的工作证实了季节早期蚜虫迁飞的重要性。例如，Heathcote 和 Broadbent（1961）于一个季节内连续数个时期用 PLRV 或 PVY 侵染分别种植在小区或大田中的生长在盆中的马铃薯，记录了蚜虫数量和随后的病毒病发生率。在季节早期几乎没有定殖于植物的蚜虫，因此病毒随蚜虫从受侵染的植株上扩散，但是到后来的季节中期情况发生很大变化，此时无翅蚜数量众多。有关早期侵袭的重要性的另一个例子参见图 12.10。

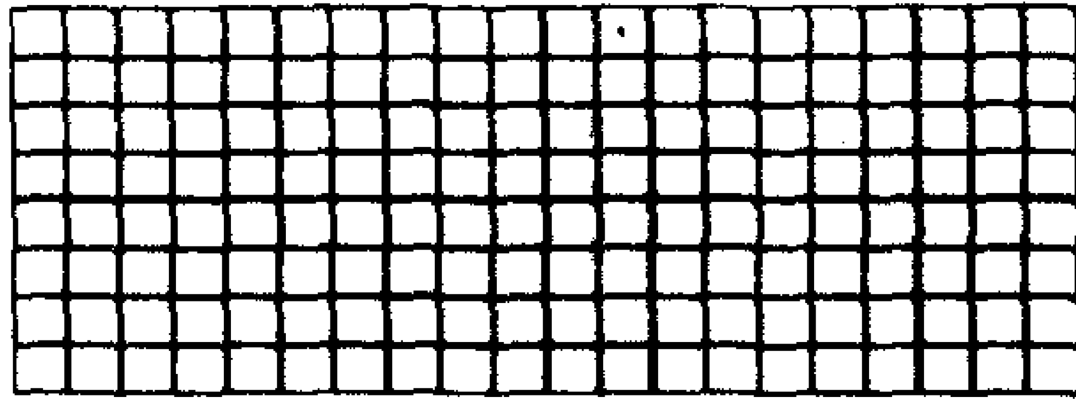
就不同的病毒而言，即使由同一组群的介体成员传播，它们在一种作物上传播的速率和类型的变化也非常大。图 12.11 列出了两种不同的传播类型。一种病毒由介体从外界传到一种作物上后，病毒不一定会从作物内的初侵染植物再传到其他植株上。如果在生长季节内入侵较晚，或者介体在作物中的出现只是暂时性的，则在作物内部的传播就很少。图 12.11 通过 WMV-2* 的传播来说明这类情况，它反映了一个瓜田的局部最初没有 WMV-2，后来受到来自几百米之外的侵染源的侵染。

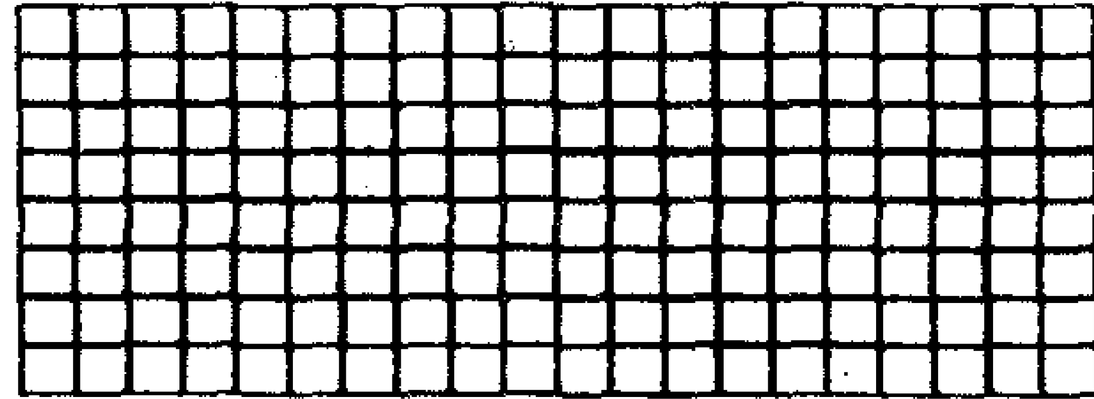
---

* 原来的 WMV-2（西瓜花叶病毒 2 号）现在称为 WMV——译者。

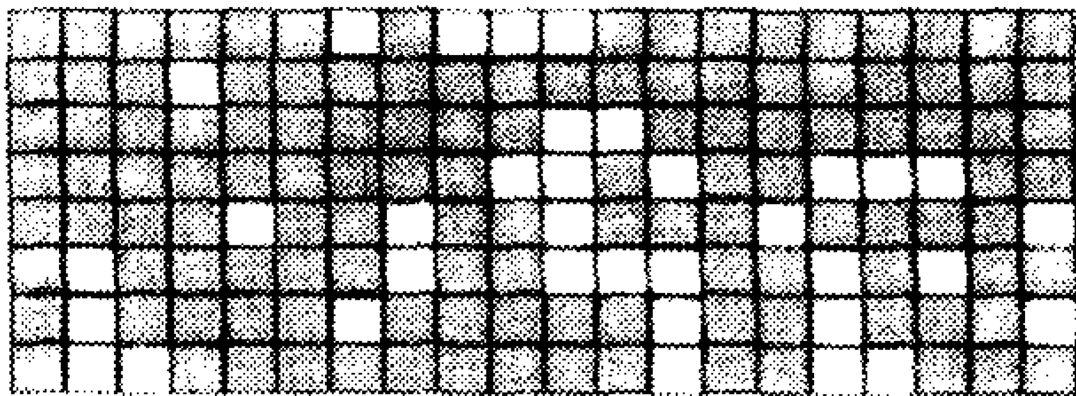
CABYV　　　　　　　　　　　　WMV

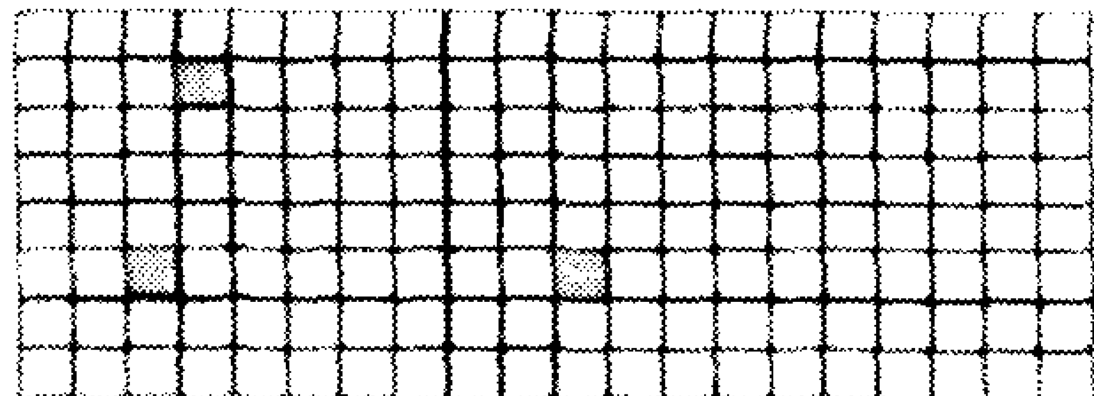
种植后天数：0



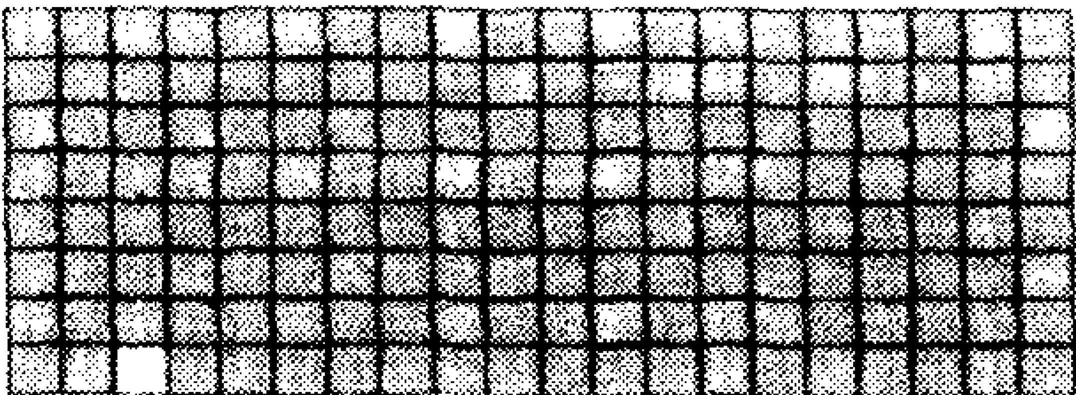


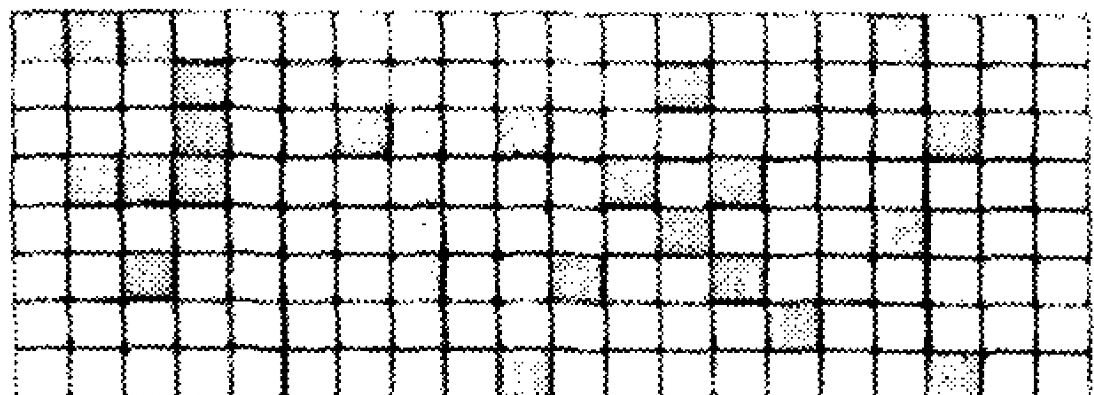
种植后天数：7



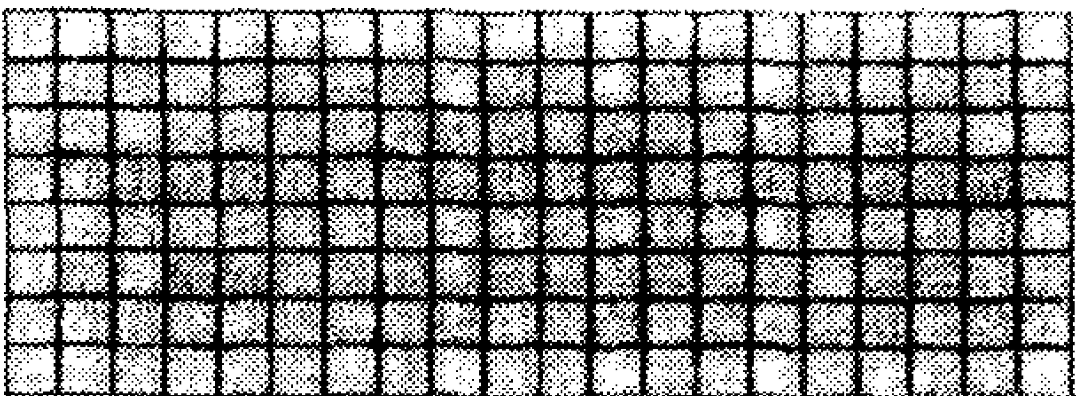


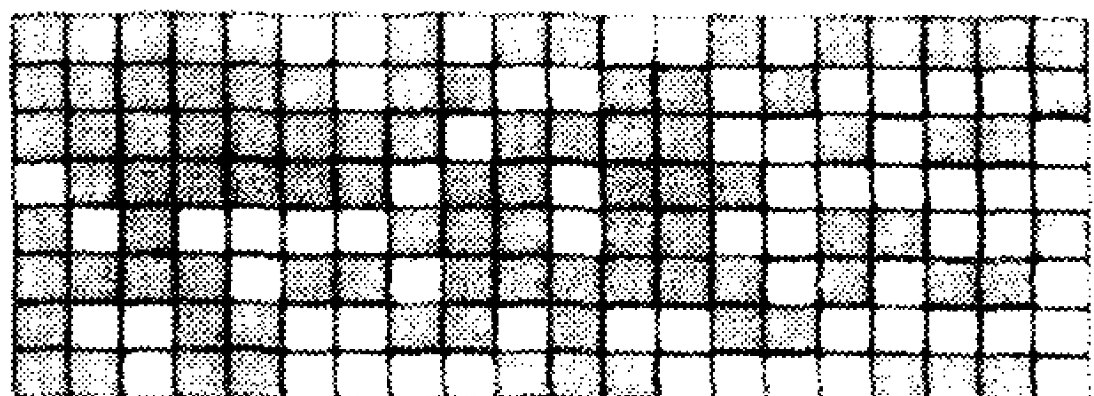
种植后天数：14



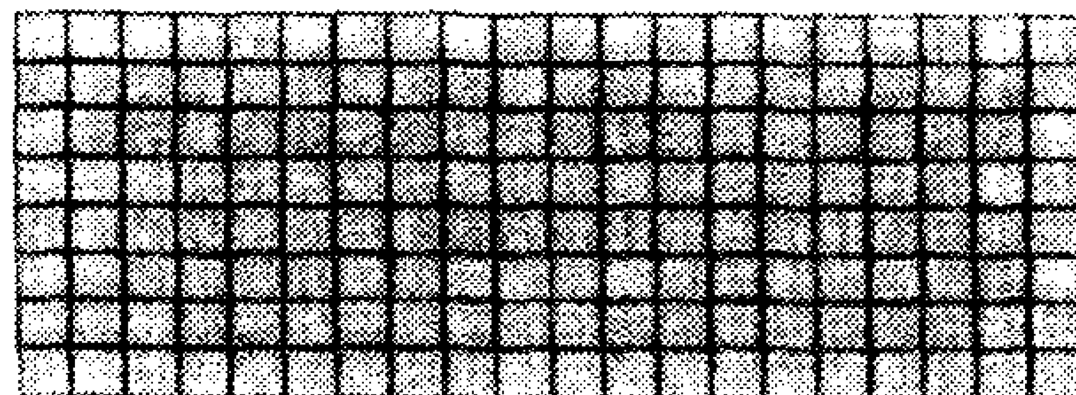


种植后天数：21





种植后天数：28



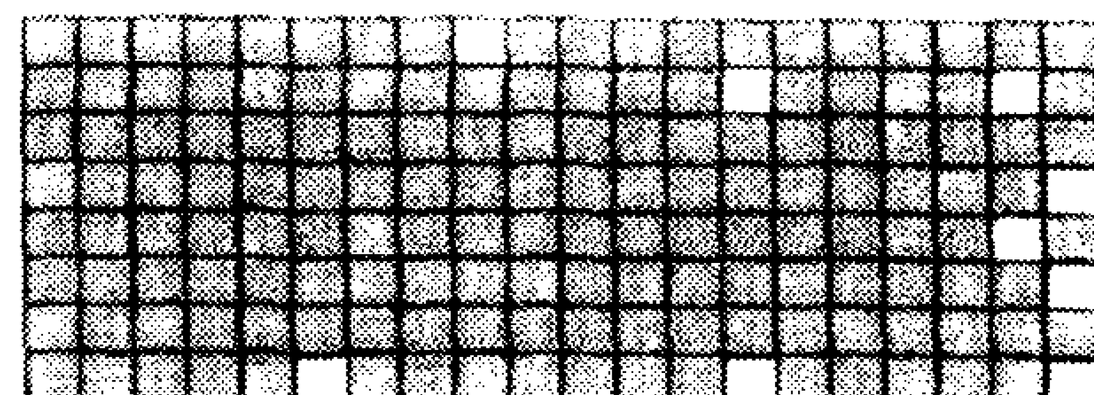


图 12.11　两种蚜传病毒在甜瓜地中的空间传播的比较。两种病毒分别由蚜虫以持久性方式（CABYV）或者非持久性方式（WMV）传播（Avignon，1992）。每个植株隔周用ELISA 检测CABYV 或 WMV 的侵染情况。每株甜瓜用白色正方形代表，当被其中一种病毒侵染后，用灰色正方形表示。4 周以后，大部分植株都被两种病毒重复侵染。承蒙惠允，引自 Lecoq（1999）。

CABYV 侵染的植物迅速增加（图 12.11）表明该病毒在作物内部植株之间的扩散已经发生。

Van der Plank（1946）建立了一种检测病毒是否从作物群体内部的发病植株发生扩散的方法。这种方法是基于一种假设，即来自作物外界的病毒会随机地侵染植物。在此基础上就存在一定频率的受侵染的植株紧邻成对存在的特定期望值（expectation）：

$$p = X[(X-1)/n]$$

式中：p 表示受侵染的植株对的期望值；n 表示连续调查的植株的数目；X 表示观察到的受侵染植株的数目。对于大的 n 值，p 的标准差为$\sqrt{p}$。

如果观察到的侵染对数目（将紧邻的3株植物记为两对）显著高于期望值，从田间受侵染植株的扩散情况就可以推测出来。一种作物内部的扩散不一定需要考虑相邻的植株，以至明显的随机分布并不能排除这种扩散的可能性。如果同时有两种形式的介体均活跃，一种向相邻植株传播，另一种跳跃式地传播到远处的植株，那么仅有一种介体在田间引起的侵染类型可能难以分清。现在有更多精密的程序用于分析一次流行期间受侵染植物分布的随机性或集中成片的程度（Madden and Campbell，1986；Madden *et al.*，1987a，b）。

目前已经建立了各种用于估测飞行蚜虫数量的诱捕设施，包括黄板诱捕、直立粘捕、圆锥网捕或抽吸诱捕器。Irwin设计的水平镶嵌绿板诱捕器已证明是有用的（Irwin and Ruesink，1986）。不同诱捕方式对于不同的蚜虫种类可能得到略有差异的结果，另外诱捕器安放的高度也会影响所得的数据。一般说来，飞行蚜虫的频数随着高度的增加而降低，而诱捕器内捕获介体种类的相对数量可能与作物上发现的相对数量不一致（Tatchell *et al.*，1988）。另外，单纯诱捕只是估计所涉及的各个种类和形态的蚜虫数目而不是传播特定病毒的蚜虫的实际数目。根本不在作物中定殖而只是在植株间迁移的蚜虫，它们的暂时有翅形式对于通过口针传播的病毒来说可能特别重要。尽管它们在总种群中可能只占很小的比例，但它们可能会从外界引入病毒，或者从作物中受侵染的植株上获得病毒，在四处移动寻找合适的取食植物时快速地将其传播。定殖蚜虫在作物中四处移动时也会是相当重要的。

从病毒传播的观点来看，理想的情况是能知道正在飞行的、并会落到目的作物上的传染性蚜虫的数目。灵敏的技术如PCR，能检测单头蚜虫体内的病毒（Stevens *et al.*，1997），但是这仍不能告诉我们此蚜虫能否传播该病毒。验证这一点可能是一个冗长乏味并且工作量非常大的任务，在涉及非持久性病毒时尤其如此。蚜虫在被捕获后必须尽快放置到健康的供试植物上。然而，当有翅蚜落到作物上时，可以收集、鉴定并在合适的植物上检测，以确定它们是否携带特定的病毒。例如，Ashby等（1979）采用风向诱捕法估测地三叶草红叶病毒的带毒介体的数目。1972～1977年间这个季节的一般情况是，40%～45%的有翅茄沟无网蚜（*Aulacorthum solani*）携带有此病毒。

Piron（1986）利用类似的诱捕法在马铃薯田收集到101种蚜虫。共有23种蚜虫可传播PVY^{N}，其中的22个种记录为此病毒的新介体。这个实验说明对于特定地方的特定病毒的生态学，需要比目前所知更多的有关田间活跃的介体的信息。

一种作物受到的侵染压（infection pressure）也可以通过另一种方法来估计，即将几组栽于盆内的诱饵植物在田间连续放置几天的周期。然后将其转移到温室内保存，并定期观察侵染情况。图12.12列出了与潜在的介体种类的流行相关的这类试验。蚜虫诱捕的频率明确地表明了柳二尾蚜（*Cavariella aegopodii*）的早期飞行对于PVY在这一特定的田块和时期内的传播是最重要的。Irwin和Ruesink（1986）讨论了介体活性的测定。如果对一些特定的病毒株系感兴趣，那么重要的是要知道所用的诱捕植物是否易于被田间发生的两种或多种株系中的一种所侵染（Marrou *et al.*，1979）。

前面的大部分讨论都是关于一种病毒所侵染的植物数目的变化。除此之外，单个植株上的病害严重度可能因为大量蚜虫所提供的病毒剂量的增加而显著提高（Smith，1967）（图12.3）。当较幼嫩的植株受到侵染时，病害一般也会更加严重。

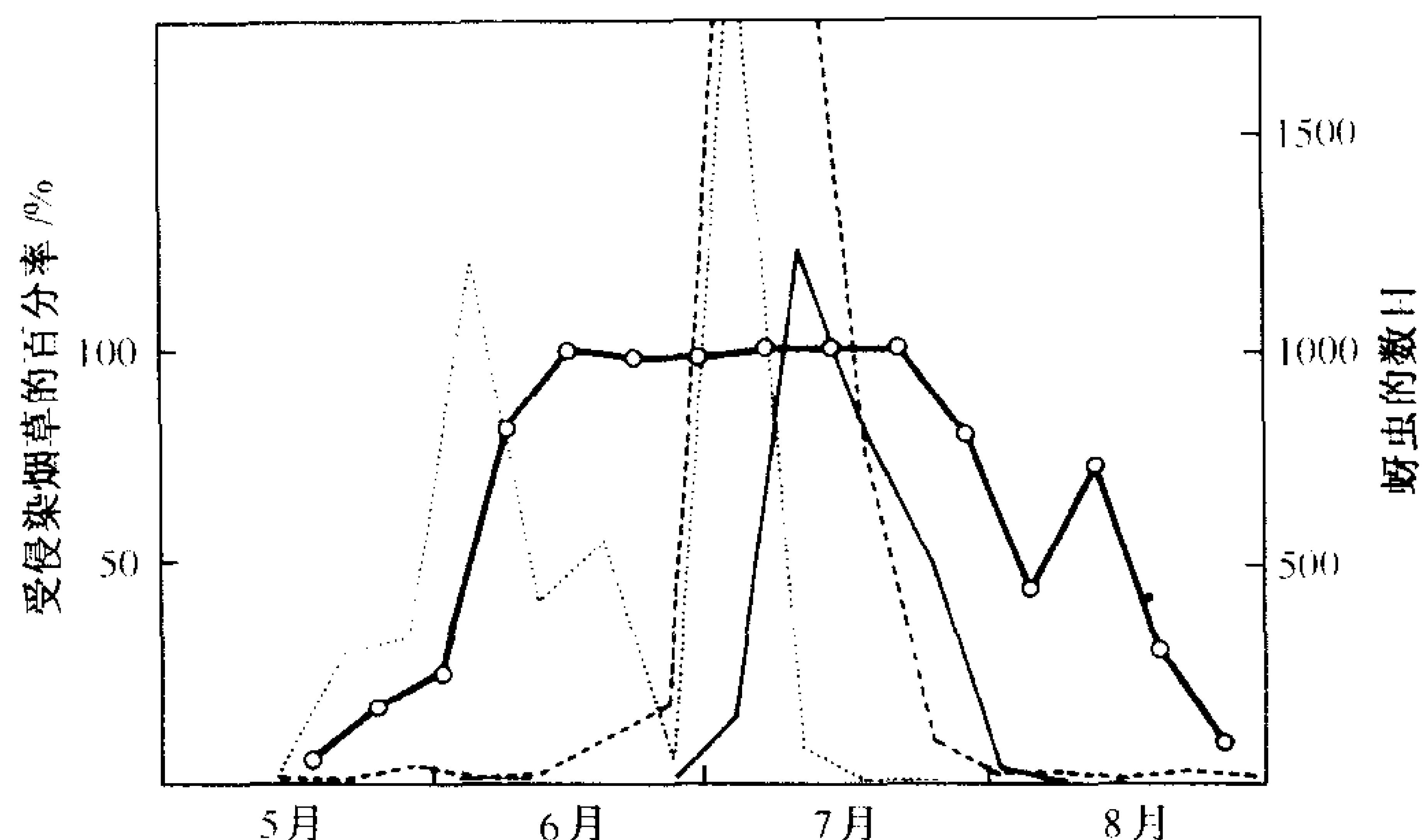


图 12.12 马铃薯田中 PVY 的侵染压。将数批（每批 100 盆）烟草植株在马铃薯田里放置 7 天。左轴和实线表明这些植株在随后转移到温室培养期间显现的 PVY 侵染的百分率。每周诱捕的 3 种蚜虫的数目以右侧轴线表示［ ，烟草受 PVY^N 侵染的百分率（%）；—，桃蚜（*Myzus persicae*）；----，麦二叉蚜（*Rhopalosiphum padi*）；……，苜蓿蚜（*Cavariella aegopodii*）］。承蒙版权所有者（© Kluwer Academic Publishers）惠允，引自 van Hoof（1977）。

已知传播不同病毒的蚜虫种类的数目差异很大。例如，SCV 只有两种介体，而有记录的 CMV 的介体已超过 60 种。

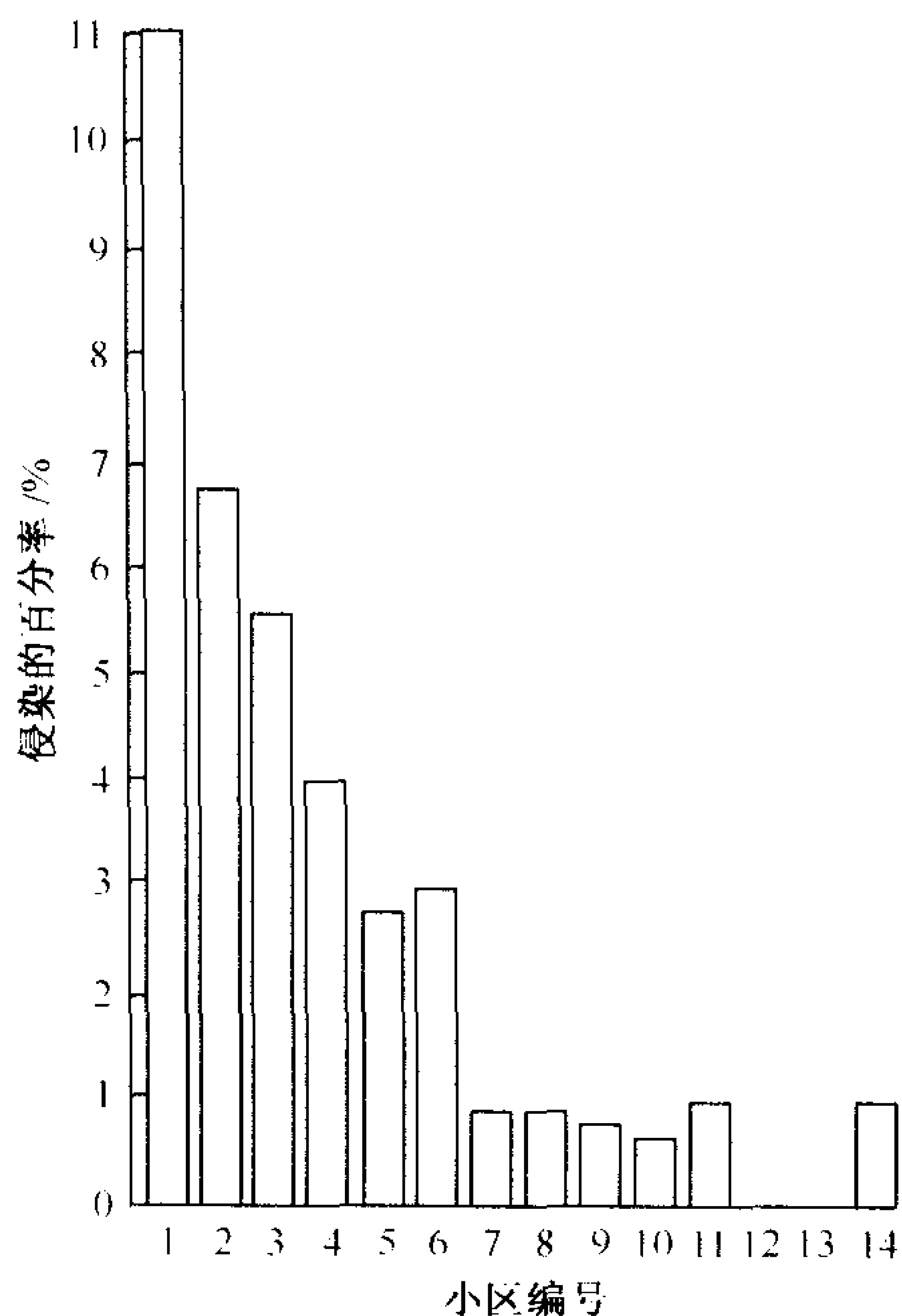


图 12.13 跳甲传播引起的侵染梯度。每小区植株的侵染率通过与侵染源的距离来作图，侵染源与第一小区相邻。TYMV 在芜菁上的自然传播扩散，每小区 2 m 宽。承蒙版权所有者（© Elsevier Science）的惠允，引自 Markham 和 Smith（1949）。

大多数有关病毒病流行学的研究都是以蚜传病毒为研究对象，这个事实反映了这类介体的重要性。当然，其他类气传介体如叶蝉（或飞虱）和甲虫在它们所传病毒的流行学和生态学方面也都是至关重要的。甲虫所引起的病毒病的发生类型可能与蚜虫和叶蝉（或飞虱）不同。例如，跳甲（flea beetle）与蚜虫在作物内的移动方式明显不同。跳甲一般比蚜虫更活跃，它们在植物间进行短距离的移动往往比有翅蚜频繁得多，然而通常不如有翅蚜移动的距离远。图 12.13 显示 TYMV 通过跳甲在芜菁田中的传播形式，与芜菁相邻种植的植物已以机械形式被此病毒侵染。将初始健康植物的田块划分成条状小区，与已侵染的植物区域平行。田里的侵染表现出明显的梯度（Markham and Smith，1949）。在某些情况下，由蚜虫传播也可观察到相似的侵染梯度。

b. 土传病毒

i. 介体未知的病毒

TMV 是通过土壤传播的少数病毒之一，

在没有任何已知介体的情况下传播可以达到任何显著的程度。如果条件合适，该病毒的稳定性能够使它在植物残体上连续存活很长时间。感病作物种植到病毒污染的土壤中将会受到侵染，推测可能是通过移栽或根生长时根部产生的小伤口引发的。介体未知的病毒，如马铃薯X病毒属和烟草花叶病毒属的成员在德国森林生态系统的土壤中广泛分布（Büttner and Nienhaus，1989）。

ii. 真菌介体传播的病毒

真菌介体传播的生态学意义取决于真菌携带病毒的方式。一些病毒如SBWMV和PMTV由其根肿菌（plasmodiophoromycete）介体的休眠孢子携带。在这些孢子内的病毒，可以于风干的土壤或储藏多年的土壤中生存。建立侵染可能需要几个季节，但是一旦在田里定殖，具有这类介体的病毒即使在缺乏合适植物寄主的情况下也能生存多年（Jones and Harrison，1972）。这些病毒的局部性传播依赖于游动孢子和休眠孢子，而土壤水则是影响局部移动的一个主要因子。这种传播类型的病毒通常寄主范围相当窄。

芸薹油壶菌（*Olpidium brassicae*）传播的病毒如TNV、STNV和CuNV被携带于孢子的表面。携带病毒的游动孢子可能仅能存活数小时。然而，土壤内的自由病毒可能被新释放的游动孢子获取并传播。如果土壤湿润，油壶菌（*Olpidium*）的游动孢子能获取在土壤中存在至少11周的TNV并加以传播。

油壶菌传播的病毒在风干的土壤中不能存活。一般来说，这类病毒有较广的寄主范围，可能通过频繁传播到连续生长的寄主上而在土壤中存活。土壤的排水和移动以及根部片段对这些病毒从一个位点向另一个位点的传播可能起重要作用。模拟试验中，将病毒加入无土的可循环供水的系统中，结果发现包括TMV等介体未知的一些病毒在内的几种病毒均可以传播（Paludan，1985）。

BNYVV的真菌介体甜菜多黏菌（*Polymyxa betae*）能形成持久稳固的菌丝块（cytosore），被传播到受BNYVV侵染的土壤中，并且菌丝块和病毒均能通过绵羊的消化系统（Heijbroek，1988）。

iii. 线虫介体传播的病毒

线虫介体传播的病毒（烟草脆裂病毒属和线虫传多面体病毒属），其生态学和流行学与气传介体传播的病毒有很大差异。线虫的寿命长，可能有广泛的寄主范围，能够在多种逆境条件中和缺乏寄主植物的情况下存活很长时间。

线虫介体没有具抵抗力的休眠期，但是能通过土壤剖面的上下移动在不利的土壤条件下生存。当土壤在夏季干燥，冬季变冷时，它们会移动到底土（subsoil）中，而当条件有利时再返回来。一些病毒（如ArMV）可以在线虫介体内越冬。

线虫传播的病毒通常具有另外两个共同的特性：寄主范围广（尤其是一年生杂草）并且在许多寄主内通过种子传播。因此，在冬季失去传染性的线虫介体到了春季可以从发芽的受侵染杂草内再次获得病毒（Murant and Taylor，1965）。

线虫在未受干扰的土壤中的蔓延是非常缓慢的。Harrison和Winslow（1961）计算出剑线虫（*Xiphinema diversicaudatum*）的一个种群以大约每年30 cm的速度侵袭未经耕作的林地。在耕作期间农事操作一般会扩大介体的分布范围，排水和洪涝发生时也有可能导致这种结果。农场工人的鞋和机械被线虫寄居的土壤污染后，既可能短距离也可能长距离地传播线虫及其所携带的病毒（Boag，1985）。然而，一种作物上所观察到

的侵染类型可能主要取决于作物种植前土壤中的介体和病毒状况。一块已经被线虫侵袭且种植了两年生或多年生作物的田块，可能需要一年或二年后侵染的早期类型才变得明显，因为侵染后大约一年叶部症状才会显现。随后的扩散可能会引起田里受侵染植株的地段缓慢扩大（图 12.14）。



图 12.14　在 Talisman 草莓上悬钩子环斑病毒（RRSV）暴发的情况。矮化植株的成片分布反映了介体逸去长针线虫（*Longidorus elongatus*）的分布情况。承蒙苏格兰园艺研究所提供照片。

长寿树种的个别树木或者树篱已经成为介体线虫的库源（图 12.15）。有时这些木本植物内也可能隐匿着某种病毒。

c. 种子和花粉传播

种子和花粉传播的发生和机制已在第Ⅲ节 A 部分加以讨论。这两种传播方式在某些病毒的生态学和流行学方面可能是至关重要的。种子内存活对于那些仅有一年生植物寄主的病毒和具有无脊椎动物介体（如正常移动非常慢的线虫）的病毒可能特别重要。

CMV 能在埋藏于土壤中至少 12 个月的繁缕种子内存活下来（Tomlinson and Walker，1973）。如果每公顷有 10^7 个种子，其中 1%被 CMV 侵染，那么 10%的出苗率将会导致大约每平方米有一株秧苗被侵染的状况。在这种情况下，CMV 侵染可能会迅速在作物中积累起来。莴苣上的 LMV 是商品化作物中种子传播具有重要性的一个典型例子。

本节下面（第Ⅳ节 A. 2. d 部分）将介绍人类活动与带病毒的种子传播的关系。借助于风或水的种子自然散布可能也是一个因素。对于靠风传播的种子来说，每株植物的种子产量可能非常高，但是浪费也很大。

花粉传播对于某些病毒而言可能是田间自然扩散中主要的，甚至是唯一的途径，如 PNRSV。另一方面，当寄主植物主要或者完全是自花授粉时，花粉散布的生态学意义可能就很小或没有，如大麦。然而，Shepherd（1972）指出，一些大麦品种能产生大量的花粉，如果花粉被 BSMV 侵染，能够通过叶片间的摩擦而引起机械传播。

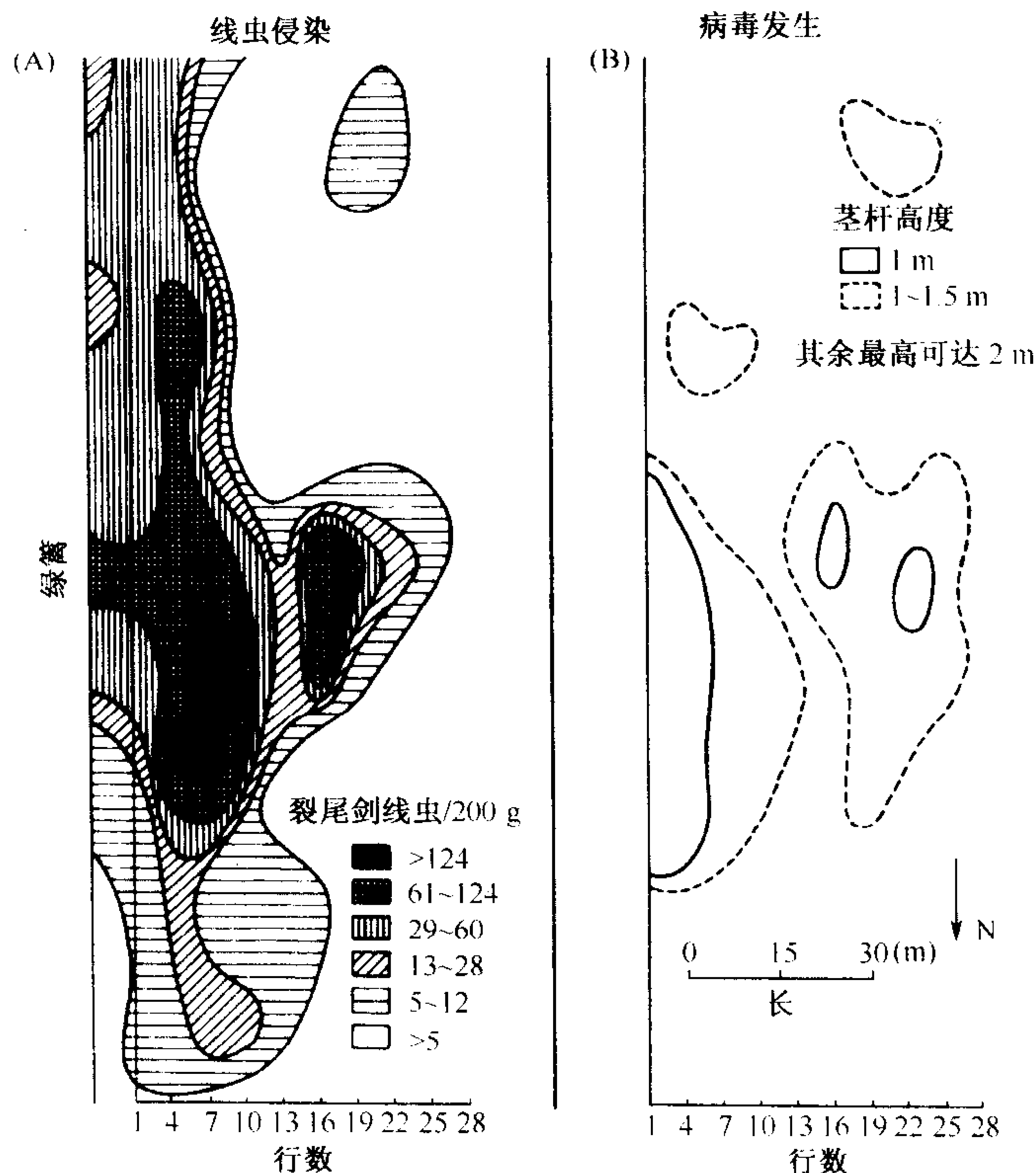


图12.15 线虫侵染密度与病毒病暴发的关系。(A)裂尾剑线虫(*Xiphinema diversicaudatum*)的种群轮廓图。(B)在一个有10年历史的悬钩子种植园里 SLRSV 的暴发情况。病毒引起茎杆高度的降低，植株的行间距为1.8 m，行内距为9.6 m。承蒙惠允，引自 Taylor 和 Thomas(1968)。

d. 长距离扩散

i. 人类的散布

正式记录某些特定病毒的到来和传播，即使对于农业技术高度发达的国家可能也很困难或者不可能做到。然而，普遍接受的一点是：在过去的几个世纪里，人类已成为许多病毒在世界范围内广泛分布的主要原因，而这些病毒在以前则局限在一个或几个地区。

病毒在植物体内或其局部（器官组织），偶尔也许会在无脊椎动物介体内被运输到其他地区。许多马铃薯病毒病害和它们的一些介体随着马铃薯从美洲被传到欧洲，此后又在块茎内被传播到其他许多国家（Jones and Harrison，1972）。LMV 是种子传播的，可能在种植莴苣的地方都有分布。TMV 能在精制的香烟中存活并具有侵染性，这个事实可能足以解释烟草商业化种植地区均有 TMV 存在的原因。

一些病毒的扩散可能是更加复杂的问题，涉及扩散的几个必要条件：一种合适的无脊椎动物或真菌介体、病毒以及合适的寄主植物。例如，Raski 和 Hewitt（1963）认为人类将葡萄藤从一个地方带到另一个地方是造成 GFLV（及其线虫介体）在世界范围内扩散的主要原因。

关于病毒在世界范围的扩散问题，新西兰是一个有趣的例子，因为它可能是在拥有多样而现代化的农业和园艺的国家中在地理上最孤立的一个。来自大洋洲波利尼西亚的移民带进一些食用植物，如芋（*Colocasia esculenta*）和甘薯（*Ipomea batatas*）。大约在过去的170年里，欧洲的移民带进一系列的农业和园艺作物，同时也伴随着大量的杂草种类。截至1990年，这个国家已经记录有139种病毒，它们都存在于引进的植物上（参见第16章第Ⅱ节E.6）。几乎所有的这些病毒都已在其他地方出现，主要是欧洲或北美洲，少数来自大洋洲。大家很容易明白，存在于块茎、球茎、长匐茎（runner）、根茎（rootstock）、种子等材料的大多数病毒是如何引进的。例如，新西兰的这139种病毒中有38种侵染营养繁殖的果树和蔓生植物。

这些病毒的大部分介体是引入的各种蚜虫。新西兰非常缺乏本土的蚜虫，它们在动物区系中的位置被木虱（*Psyllidae*）取代。尽管新西兰有一些潜在的叶蝉介体属的代表种类出现，但令人惊奇的是，几乎未发现具有叶蝉介体的病毒。

还有一些其他例子可能将更准确地说明人类活动影响的年代。PPV侵染李属（*Prunus* spp.）植物，通过蚜虫以非持久性方式传播。这种病害1915年在保加利亚最早报道，从此在欧洲扩散，如图12.16所示。蚜虫将此病毒传播到附近的果树上。长距离传播可能主要是通过人类散布植物的营养繁殖材料而发生的（Walkey，1985）。

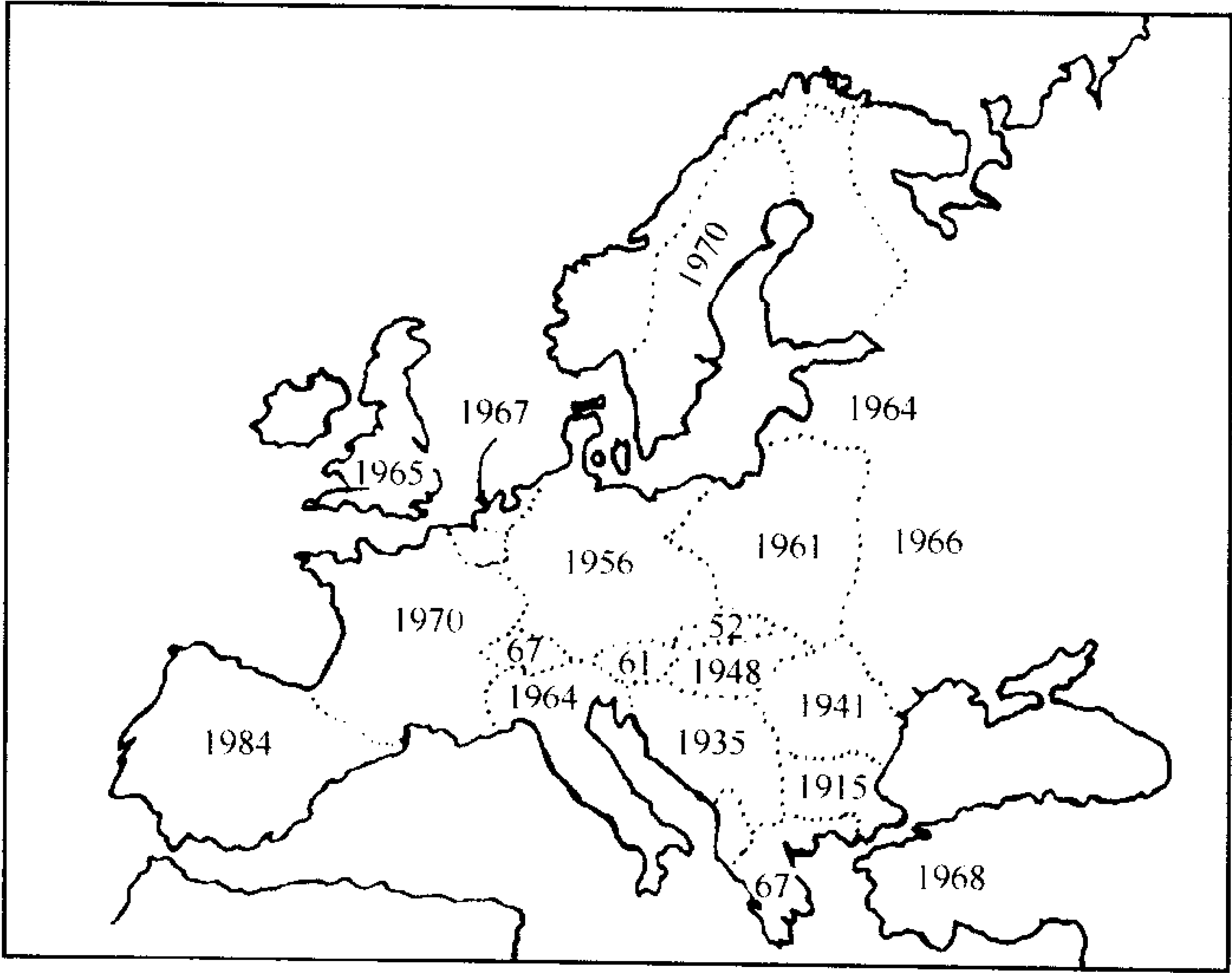


图12.16 李痘病毒（PPV）在欧洲和西亚的首次报道情况。日期表明了各地（国）首次记录该病毒的年份。承蒙惠允，来自J.M. Thresh。

BNYVV在甜菜上引起重要的丛根病（rhizomania），有关其近年来的扩散情况参见表16.1的总结。进入新环境的病毒，有时可能遇到适合迅速传播的条件。Stubbs（1956）指出胡萝卜杂色矮缩病毒（carrot motley dwarf virus）病在澳大利亚扩散非常快，因为它的蚜虫介体柳二尾蚜作为引入的种类已经大量存在，并且缺乏天敌。与此相反，该病害在加利福尼亚的扩散很慢，因为那里的蚜虫介体遭到严重寄生。

人类的活动可以在一个国家内传播病毒和介体。例如，英国南部苗圃的土壤中经常

存在线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）及其介体，它们随着寄主植物被运输出去，尤其是在发生潜伏侵染时（Sweet，1975）。

ii. 气传介体

蚜虫介体在病毒的长距离和短距离扩散中相当重要。对于非持久性病毒和持久性病毒可能都是如此。例如，英国对蚜虫移动的详细研究表明，只要存在合适的寄主植物，重要的蚜虫种类每年都可能再度定殖整个大不列颠岛（Taylor，1986）。这种移动有时长达 1000 km 的距离，然而通常不是一次飞行完成的，也可能涉及几次连续的定殖。

另一方面，气候条件合适时，持续的长距离移动可能并不罕见。地转气流（geostrophic airstream）是在大约 1000 m 高度上、气体沿着相当大范围的气象系统的等压线（isobar）进行的移动。这种气流几乎已经导致大量有翅蚜从澳大利亚运输到新西兰，跨海大约 2000 km 的距离（Close and Tomlinson，1975）。LNYV 和几种蚜虫介体可能就是通过这种方式传入的。一个显示气候对蚜虫移动的可能影响的例子如图 12.17 所示。不仅病毒，而且其潜在的蚜虫介体也正在陆续地传入到新的大陆。因此，BYDV 的一种传播介体蚜虫 *Metopalophium dirhodum*，1985 年在澳大利亚首次记录，几乎可以肯定是近期才传入的（Waterhouse and Helms，1985）。

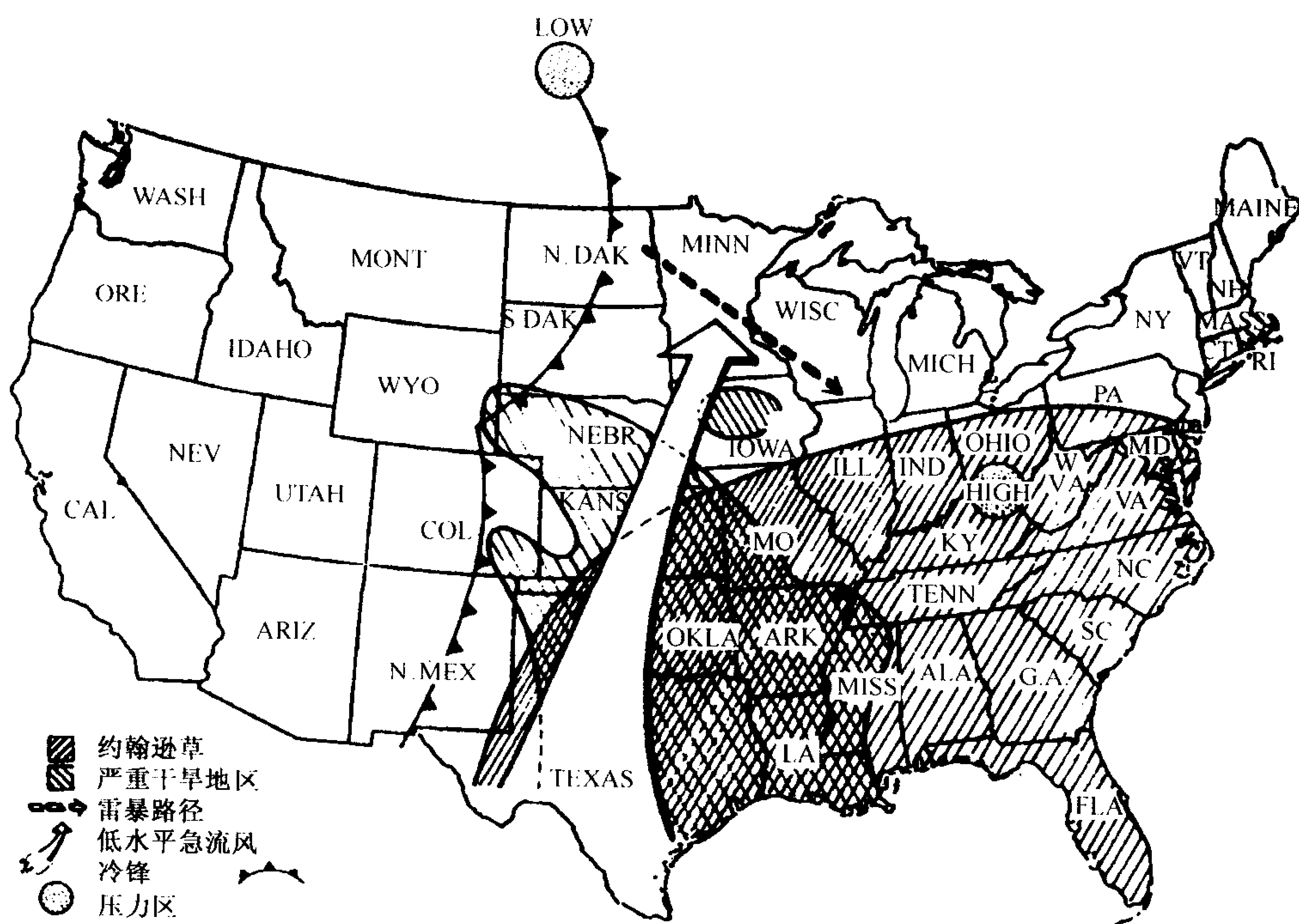


图 12.17　解释蚜虫长距离移动以及 1977 年 MDMV 在美国明尼苏达州（Minnesota）玉米上大规模暴发的假说。在 1977 年 5 月和 6 月的严重干旱条件下，美国大陆的中部以及南部地区约翰逊草的分布情况（未注明西部的分布情况），该草是 MDMV 的主要野生寄主。大箭头指的是 1977 年 7 月 2 日低水平急流风（jet wind）（时速高达 80 km）的走向；较小的虚线箭头指示的是导致该低水平急流风发生扩散并激发雷暴活动的冷锋的路径，它向东南偏南方向移动，经过明尼苏达州（Minnesota，MINN），在 7 月 2 日深夜和 7 月 3 日清晨进入威斯康星州（Wisconsin，WISC）。承蒙惠允，引自 Zeyen 等（1987）。

叶蝉介体也可以长距离移动。例如，大量的紫菀叶蝉（*Macrosteles fascifrons*）每年春季可能从墨西哥湾北部大约 300 km 的越冬地区，途经美国中西部到达加拿大的草原各省（prairie provinces）(Chiykowski and Chapman，1965)。BYDV 和麦蚜（cereal aphids）也采取相似的路径迁飞。

花粉和种子传播。花粉和风传（wind-borne）种子的传播有时对于病毒的短距离扩散是重要的。种传病毒也许可通过鸟类输送到很远的地方，但是还没有记载的例子。Proctor (1968) 指出种子可以在迁移海鸟的消化道内保持活力长达 340 h，足以被运输数千千米远。

水传播。许多年来，已经建立了检测水中人类和动物病毒的各种方法。这些方法也用于水传（water-borne）植物病毒方面，尤其在欧洲已取得了一些令人惊奇的结果。Koenig (1986) 对此工作进行了综述。大多数样品都是从河流和湖泊中取出的。从这些水中分离到的侵染性病毒包括：TMV、CGMV 和其他烟草花叶病毒属病毒，一种马铃薯 X 病毒属病毒，TNV 与 STNV，TBSV、CIRV 和其他番茄丛矮病毒属病毒，CarMV、CMV 以及 CRSV。另外，从波罗的海的海水中也分离到 CarMV (Kontzog *et al.*，1988)。这些病毒中许多具有一些共同的特性：大多数非常稳定，缺乏长距离传播的气传介体。它们在受侵染植物内发生的密度非常高，从受侵染的根部释放，在没有介体的情况下能侵染根部。其中许多病毒的寄主范围相当广。大多数侵染性病毒可能吸附到有机或无机的胶体颗粒特别是黏土粒上并在水中移动（Koenig，1986）。这种处于结合状态的病毒与自由的病毒相比，更不易被钝化。

水中发现的病毒来自于活的根部病毒的释放，或者来自于腐烂的植物材料，或者来自于污水。Tomlinson 和 Faithfull (1984) 从英国泰晤士河的水中分离到 TBSV。另外，在各种污水厂初级沉降床的半固态或干燥淤泥中生长的大量番茄植株上也曾分离到该病毒和其他病毒。他们的结论是，这些番茄植株与至少其中一些病毒源自于人们生食的受侵染的番茄。已知 TBSV 在通过人的消化道时仍然保持侵染性（Tomlinson *et al.*，1982)。从德国北部一个污水厂附近的运河水中曾分离到 CRSV，再次表明污水对病毒的长距离扩散的作用（Koenig *et al.*，1988b)。这些水传病毒可能是欧洲森林衰退的一个因素，但是这个问题还需要进一步的研究（Koenig，1986；Büttner *et al.*，1987)。

3. 栽培措施

特定作物在特定地点的种植和栽培方式、一年内土地的利用方式都会对作物病毒病害的发生有显著的影响。当然，我们也可以通过合理的栽培措施来预防侵染。栽培措施会涉及许多因素，下面将列出一些有关的因素。

a. 栽培日期

在这方面一个很鲜明的例子是，播种日期可影响加拿大 Alberta 省南方冬小麦的病毒发生率。在播种季节，侵染后产生条纹花叶症状是与种子的播种时间和地点密切相关的（Slykhuis *et al.*，1957)。如果早于 9 月播种，就会与春播的带病毒作物有交叉时期。较高的气温可能会引起一些蚜虫介体种群的急剧减少。假如把秋播作物的播种日期推迟直到这种高温条件占优势，那么在一种作物上传播的病毒将大幅减少。另一个关于播种日期重要性的例子见图 12.18。图 16.6 表明与介体迁移和病毒控制措施相关的播

种日期的重要性。

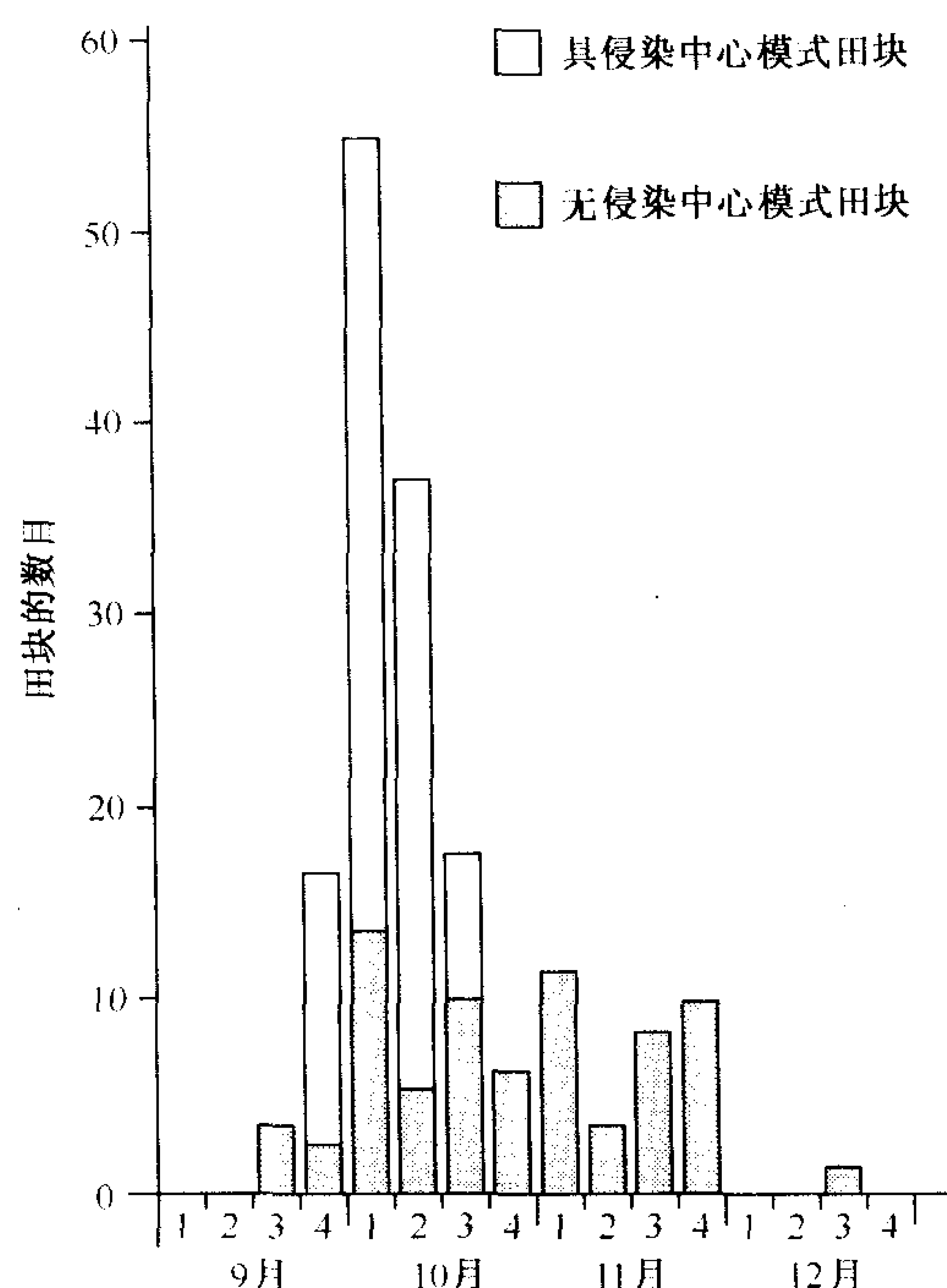


图 12.18 1976 年和 1977 年小麦的播种时间对英国南部小麦上 BYDV 发生率的影响，这是通过空中观察侵染中心（focus of infection）来估计的。没有阴影的柱表示受到明显侵染的田地，阴影的柱表示明显未受侵染的田地。承蒙版权所有者（© Blackwell Science Ltd.）惠允，引自 Hill（1987）。

因栽培措施的改变而提供了一种越冬作物可能会使病毒的发生率提高。因此，在英国 BaYMV 发生量的增加部分是由于将制造麦芽的冬大麦作为有利可图的春季作物播种，从而使病毒通过其真菌介体而能一直存在（Coutts，1986）。BaYMV 的增多也与英国多个地区将春播大麦改为秋播有关。在华盛顿州，冬小麦上的 BYDV 发生率在灌区最高，这些地区在夏季有利于蚜虫介体，同时与播种日期早也有关系（Wyatt *et al.*，1988）。

种植日期在热带地区也很重要。例如，Manwan 等（1987）对印度尼西亚的 Maros 和 Lanrang 地区的水稻播种时间进行了 7 年的研究，提出了最佳的播种时间以避免东格鲁病毒病的发生。这个时间的判定是基于此时叶蝉种群少，而气象条件又适合于播种水稻。

b. 作物的轮作

有些病毒能在杂草或其他植物上越冬，作物轮作方式可能对这些病毒的发生有显著的影响。对于某些作物，病毒的寄主可以大量存活很长时期。Doncaster 和 Gregory（1948）表明可能需要 5～6 年来清除马铃薯种植地块的带毒马铃薯。

对于像胡萝卜这样的植物来说，用于种子生产和块根生产的田块以及田间自生植株（volunteer plant）可能形成连续的年循环使得病毒一直存在（Howell and Mink，1977）。图 12.19 表明了自生植物在甜菜病毒传播中的重要性。对于多年生作物来说，病毒发生率会随着作物的生理龄的增长而提高。

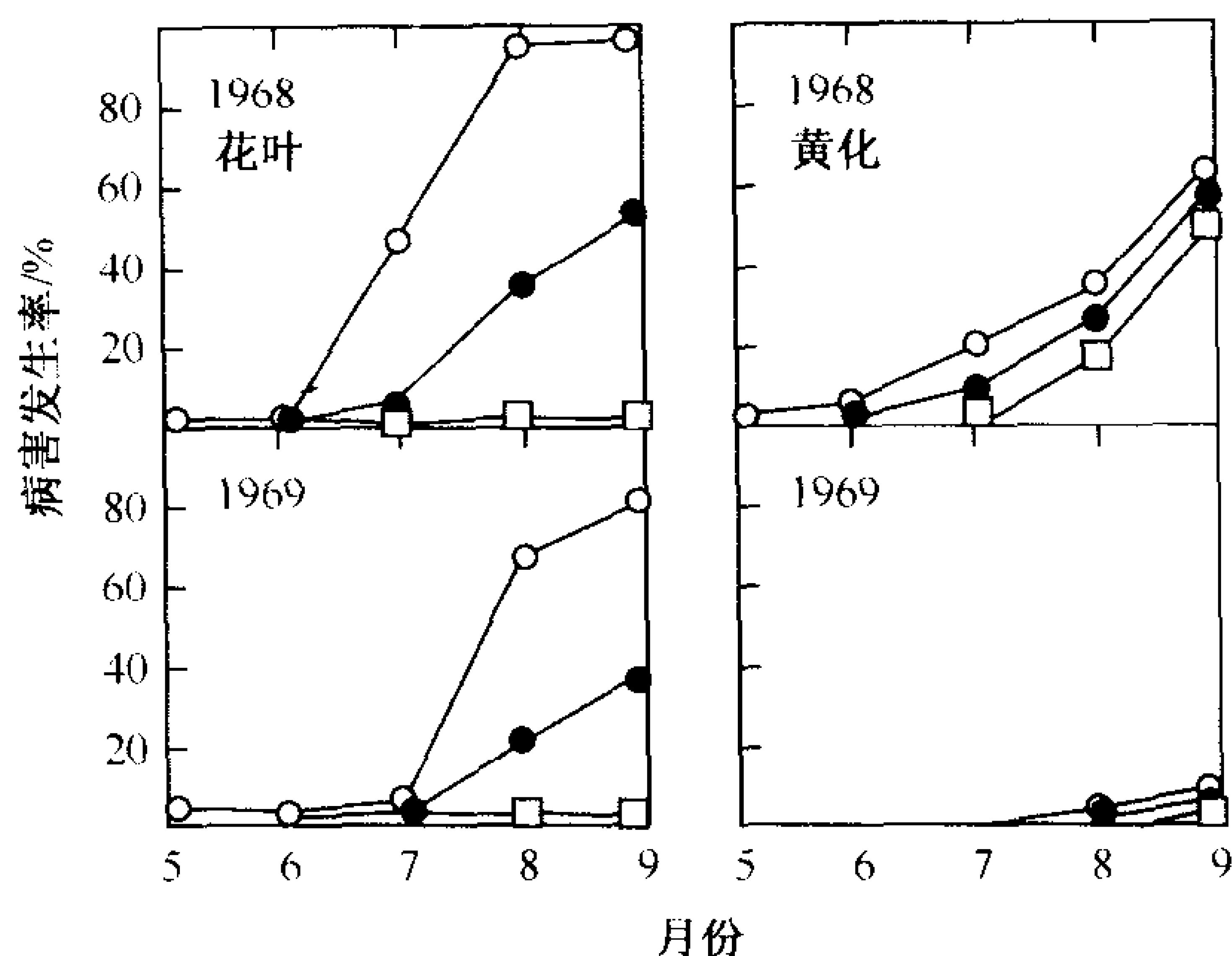


图 12.19 在 1968 年和 1969 年间华盛顿州甜菜产区自生甜菜植株与甜菜花叶病毒（BtMV）、甜菜西方黄化病毒（BWYV）之间的关系。○，含有自生植株的田；●，与自生植株相邻的田；□，与已知的自生植株相距至少 1 英里（1 mile＝1.609 34 km）的田。承蒙版权所有者（© American Phytopathological Society）惠允，引自 Howell 和 Mink（1971）。

c. 土壤耕作

土壤的耕作措施可能会影响病毒在土壤和病残体中的传播和存活。在耕作中，线虫和真菌介体可以通过土壤的移动而扩散。土壤通气和保湿的程度会影响 TMV 在植物病残体中的存活。若先前它在霜冻的天气耕地可明显降低自生马铃薯植株的存活率（Doncaster and Gregory，1948）。

通常认为灌溉可以显著地提高 BNYVV 的扩散水平。然而，通过比较由土壤翻耕和收获操作等物理的移动和灌溉引起的病毒扩散情况，证明前者是该病毒由点到面扩散的主要方式。

d. 田块面积

田块面积对病毒扩散的影响在很大程度上依赖于最初的侵染源。假如病毒是来源于作物外的，那么，正如 Van der Plank（1948）所指出的，将作物集中在大片地块种植会将来自作物外病毒侵染降到最低程度。例如，这种情况已经在紫花苜蓿的 AMV 中发生。

e. 种群密度和植株大小

当某个地块的植株较为分散时，气传介体就会携带外来的病毒侵染更多的植株。例如，当植株间或行间距离缩小，则甜菜黄化也会减轻（Blencowe and Tinsley，1951）。作物的空间分布可能会影响到迁飞蚜虫的落地反应。密植的花生受到有翅蚜的侵染要少于稀植的植株（Hull，1964）。植株在行内和行间密布相连会降低有翅蚜的发生频率。有些种类的蚜虫在种植间距大的鸭茅和羽衣甘蓝中更常被捕获（A'Brook，1973）。

作物中大的植株要比小的植株更容易受到昆虫传播的病毒的侵染，因为它们被介体侵袭的概率更大。Broadbent（1957）发现在花椰菜的苗床中存在这种情况。在一年内，30%的大苗、15%的中等大小苗和 5%的小苗受到了 CaMV 的侵染。

f. 温室的影响

使用温室和聚乙烯塑料大棚可能会有利于 TMV 的存活，因为这种结构是固定的，

同时采用集约型耕作方式。另一方面，这些结构可能会对控制蚜传病毒有一定保护作用。因此，Conti 和 Masenga（1977）报道在山麓地带种植于塑料棚受病毒侵染的辣椒植株中，84%含有 TMV。其余 16%受到蚜传病毒的侵染。相比之下，88%种植于室外的辣椒受到病毒侵染后所携带的都是由蚜虫以非持久性方式传播的病毒。温室通常在冬季寒冷的地区使用，因此更有利于适应于热带和亚热带气候的病毒如 TSWV 的侵入。

g. 授粉操作

种植不同品种植物的园艺操作或在果园授粉都有助于花粉传病毒的传播。Howell 和 Mink（1988）提供了详细的证据表明每年在甜樱桃园出现的新的 PNRSV 侵染是由于将商业性蜂箱直接从较早开花的果园转移至后开花的果园引起的。

h. 作为侵染源的苗圃和大田

苗圃可以作为病毒侵染的重要来源，特别是当它们已被使用了多年后。例如，Hampton（1988）在美国的几个州野生的啤酒花（*Humulus lupulus*）上未发现以下病毒的侵染：在栽培的啤酒花中经常存在的两种等径不稳环斑病毒属病毒（ilarviruses），以及 3 种香石竹潜隐病毒属病毒（carlaviruses），尤其是 AHLV。几百株通过在俄勒冈州（Oregon）运用育种措施而得到的啤酒花中这些病毒的侵染率很高。种植在侵染的啤酒花附近的 53 种非啤酒花植株未受到 AHLV 的侵染。因此，商品田和苗圃看来是这种病毒的唯一侵染源。

用于水稻移植的苗床对水稻东格鲁病的流行有重要的影响。幼嫩的植株对病毒侵染很敏感，此外，将植株拔起后移植的过程也会对叶蝉有影响，使其转移到其他植株上（Mukhopadhyay and Chowdhury，1973）。

作物向新的地区的转移

人类除了将病毒在世界各地传播外（参见第Ⅳ节 A. 2. d），还将各种作物种引进新的国家，由于病毒的侵染，通常会引起严重的后果。原产地没有病毒侵染的植物种出于商业目的被引入新的地区后，可能会受到引入地区长期存在的病毒的侵染。要证明这类事件的发生很困难，特别是如果这种转移发生在病毒学家能够观察和记录这种迁移之前。Thresh（1980）详述了几个例子。CSSV 是一个重要的例子，因为可可树在数个西非国家的经济中有着重要的作用。可可树是在 19 世纪后期从亚马孙河流域的丛林移栽到西非的，此后可可树作成为西非的主要经济作物。有关可可肿枝病的首次报道是在 1936 年，它很可能是从西非所固有的病毒寄主树木上经粉蚧传播到可可树上引起的。

植物种类在国家和大陆间的转移在过去的两个世纪中愈加频繁。印度、北美和澳大利亚的农业基本上依赖于引进各种作物（Thresh，1980）。因此，这些地区出现类似于可可树转移导致的情况更多。

i. 单一作物制

长期连续地大面积种植单一作物或主要种植一种作物会导致病毒病的流行，特别是在涉及气传介体的情况下。图 12. 20 表明了这种流行的发展情况。土传介体也很重要，例如，多年种植葡萄的葡萄园中的 GFLV。单一作物可以导致作物残体的堆积，以及与特定作物相伴随的杂草的泛滥。

正如 Diener（1987a）所指出的，许多作物的类病毒病只是在近几十年才出现。他认为类病毒本身在野生寄主中已存在了很长时期，几乎不导致病害。有时类病毒会被引

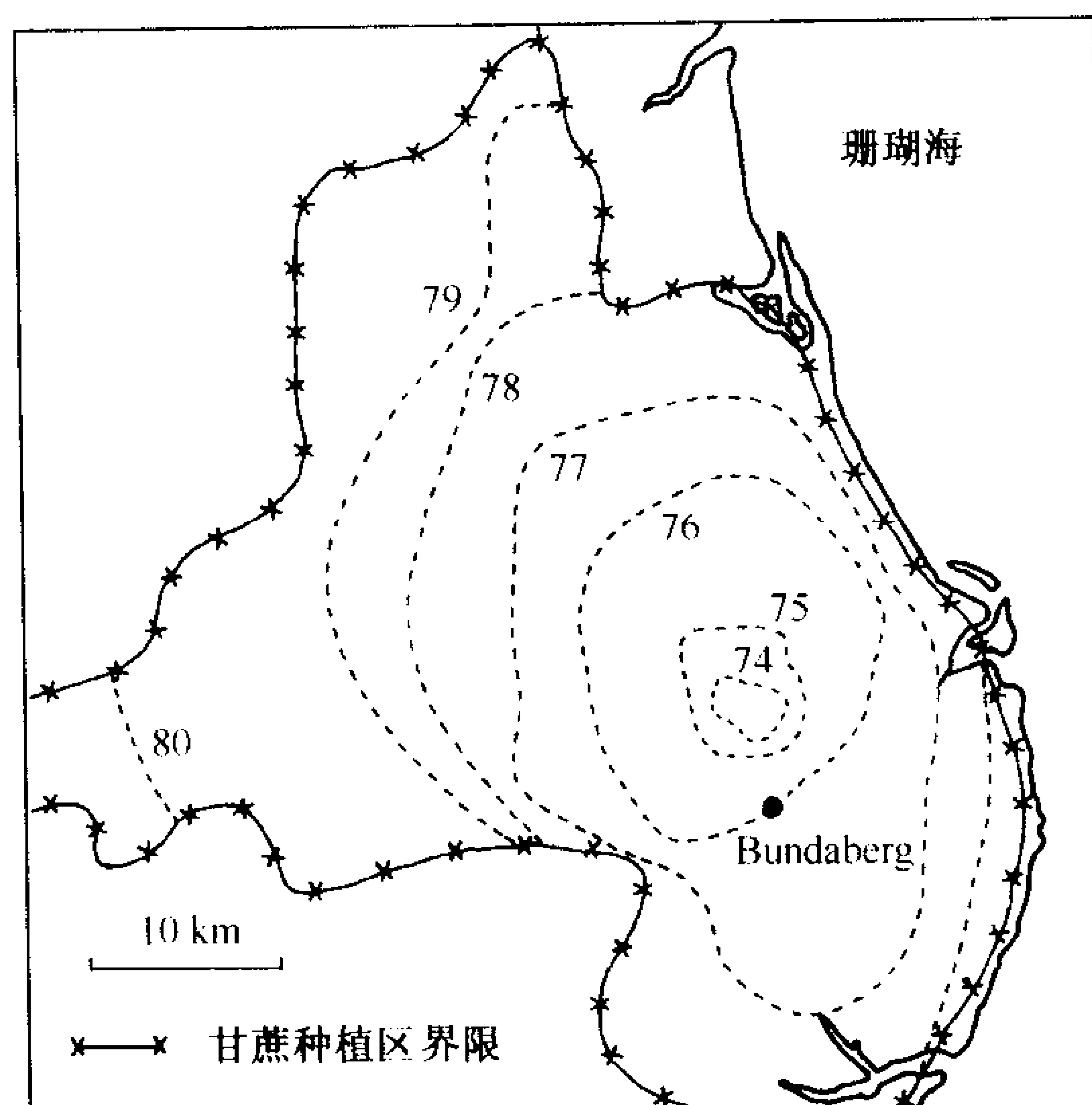


图 12.20　7 年中在甘蔗上飞虱传播的病毒病的流行趋势。1974～1980 年间在澳大利亚昆士兰州的 Bundaberg 地区甘蔗斐济病毒病发生情况。病害发生的轮廓图（虚线）指明了平均至少 1%的甘蔗受到侵染的地区的界限。实线为主要甘蔗种植区的外部界限。承蒙版权所有者（© Blackwell Science Ltd.）惠允，修改自 Egan 和 Hall（1983）。

入农作物中，但由于作物遗传构成的多样性以及种植面积小，不会引起大的病害。然而，随着现代大面积种植遗传上均一的植物，出现类病毒病严重暴发的机会大大增加，特别是对于菊花这类营养体原种繁殖可能高度集中的植物来说更是如此。

关于单一作物制的后果有一个突出的例子，那就是由于大约 35 年前开始的绿色革命使某些水稻的病毒病及其介体的重要性增加。在热带和亚热带地区引入新的水稻品种作为绿色革命的一部分对于水稻产量的增加有很大作用。然而，由于几种水稻病毒病及其介体的流行严重阻碍了产量的提高（Thresh，1988a）。一个典型的例子就是 RGSV 和 RRSV 及其介体褐飞虱（*Nilaparvata lugens*）。除了传播病毒外，褐飞虱本身能引起严重的作物产量损失。第一批水稻新品种在 1966～1971 年间应用，对介体和 RGSV 都敏感。育种家发现对两者都有抗性的有效抗源（source of resistance）后将其导入新的品种，然后在 1974～1975 年释放。这些种类起初在菲律宾、印度尼西亚以及其他地方广泛且成功地种植。然而，2～3 年间就有褐飞虱严重侵入的报道，在 1982～1983 年，报道了一种能够打破抗性的 RGSV 株系。虽然没有发现新的病毒抗源，但发现了新的昆虫抗源并将其整合进新的品种，在这种新品种应用了一些年后，其抗性最终还是被新的昆虫生态型所打破（Thresh，1989）。

即使在一个国家，农业措施的发展亦可能会在很大程度上影响特定植物病毒的侵染。例如，新西兰本土的澳洲茄（*Solanum laciniatum*）在自然条件下没有病毒侵染，但在商业化种植开始不久后，就有报道在田间受到了 PVX、PVY、TMV 以及 CMV 的侵染（Thomson，1976）。

B. 物理因子

1. 降雨

降雨可能会影响气传和土传的病毒介体。降雨时间和强度都可能影响介体的种群。例如，适当的降雨和高湿对粉虱种群的建立是必需的，而持续的大雨可能会降低种群的大小（Vetten and Allen，1983）。同样地，强降雨也会使刚到达作物的蚜虫数量降低，因此，减轻了病毒的危害（Wallin and Loonan，1971）。

在苏格兰一些降雨量最大的地区 PMTV 发生率也最大（Cooper and Hanison，1973），这是由于它的真菌介体适合在潮湿的土壤中生存。类似地，在秘鲁这种病毒广泛分布于安第斯山脉的高地上种植的茄属植物中，这是因为这个地区的降雨和温度适合于真菌介体生存（Salazar and Jones，1975）。在干燥的沿海地区则未出现病毒病症状。

2. 风

风作为一个重要因子不仅可以促进或抑制气传介体对病毒的传播，而且可以影响传播的主要方向。防风林（windbreak）以复杂的方式影响介体和病毒在当地的发生率（Lewis and Dibley，1970）。在风速过大时有翅蚜一般不飞行，因为它们的飞行方向会受到主要风向的影响。在风速小的时候，一些种类的蚜虫可以随着风向飞行，而另一些则逆风而飞（图 12.21）。

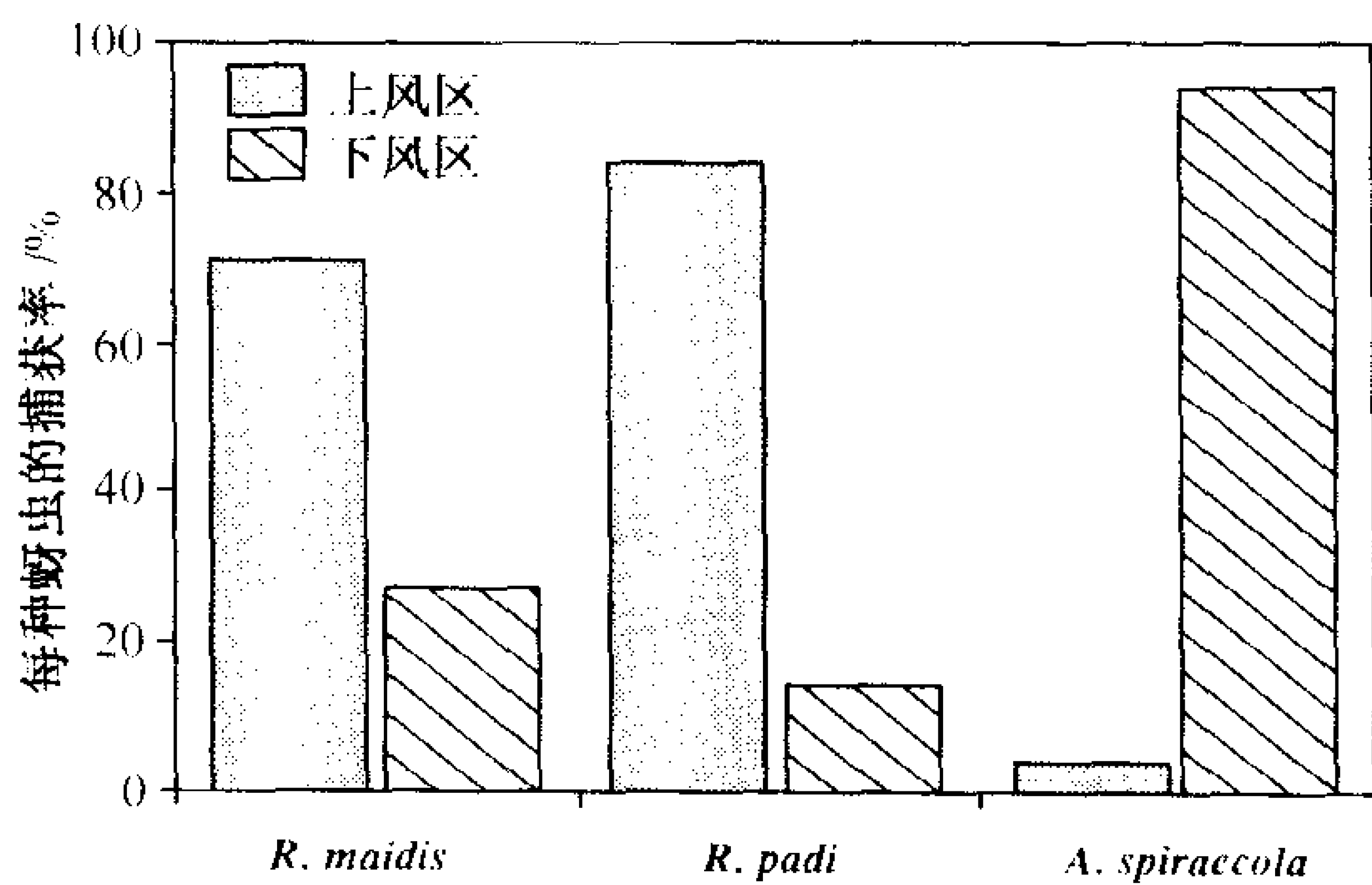


图 12.21 低风速下不同种类蚜虫飞行方向的差异。1978 年，在美国的伊利诺伊州的 Urbana，在一根高于大豆冠层的黏性圆柱的向风面和背风面收集到的特定蚜虫种的百分比。承蒙惠允，修改自 Irwin 和 Ruesink（1986）。

异常的风况可能会导致每年的病害流行。1977 年美国北部的明尼苏达州的玉米发生了 MDMV 的大面积流行，这是没有预料到的，因为该病毒通常局限于美国南部。从对 1977 年大陆的气候分析以及蚜虫能够携毒超过 19 h 这两方面看，Zeyen 等（1987）提出低水平急流风可快速地使传染性的蚜虫介体从干旱的南部地区迁移到北部的明尼苏达州（图 12.17）。

叶蝉的运动方向很大程度上会受到风速和风向的影响。当风速大于 3 km/h 时，甜

菜叶蝉不能前进。粉虱的移动也受到风的很大影响（图 12.22）。粉蚧可传播可可肿枝病，它们在植物上相当不活跃，尽管它们可由蚂蚁携带，但通常只能移动很短的距离。然而，在其低龄阶段可以被风传播一段距离。

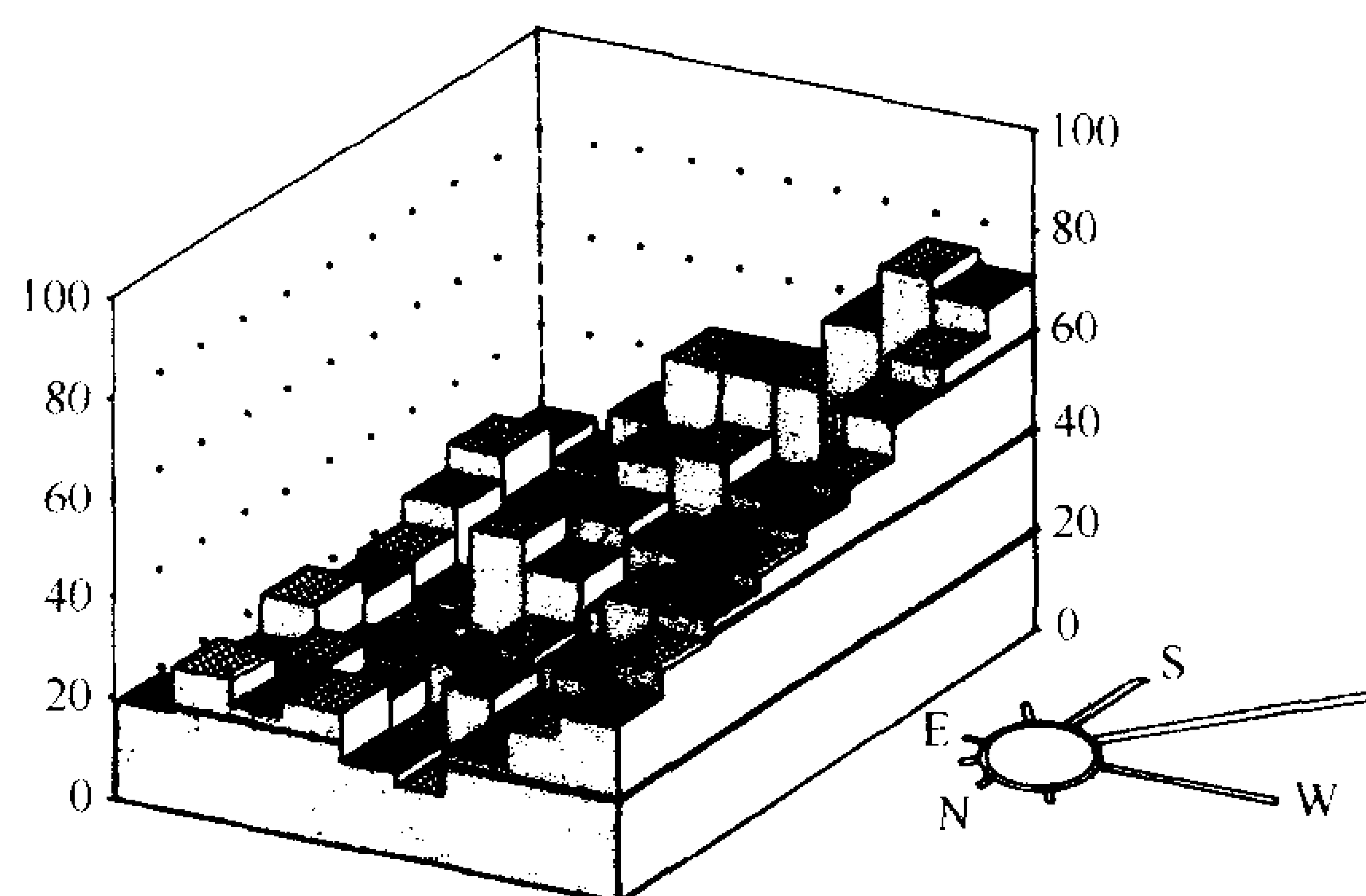


图 12.22 在科特迪瓦（Côte d'Ivoire）的海岸地区由甘蔗防风带包围的 0.8 hm^2 木薯地中ACMV的发生情况与风向的关系。0～100 表示每个小区植株受侵染的百分率。风的频率和风向通过右下角小图中线条的距离和方向来表示。粉虱（*Bemisia*）介体的捕获情况与病毒的发生率很类似。承蒙惠允，引自 Fargette 等（1985）。

黑醋栗退化病毒（*Blackcurrant reversion virus*）是由瘿螨（gall mite）（*Phytoptus ribis*）介体传播的，其传播很易受到风的影响，可以从侵染的植株转移 15 m。然而，其他的一些因素，例如，附近建筑和树木引起的湍流也可能影响到这种介体的被动转移以及病毒的移动（Thresh，1966）。在一定的气候和土壤类型下，许多属的线虫可以被风传的尘土所携带（Orr and Newton，1971）。然而，能够被尘土传播的病毒介体的种类还未鉴定。

3. 气温

气温对气传病毒介体的繁殖和运动有显著的影响。例如，有翅蚜只在比较温暖的条件下飞行，然而，高温对于减少某些蚜虫的种群特别有效。

将 MRDV 的飞虱介体暴露于 36°C 时阻止了该病毒在介体中的复制，并且抑制了病毒的传播（Klein and Harpaz，1970）。这种气温在以色列的炎热夏季时常出现。

4. 土壤

土壤条件可以在不同方面影响到病毒病的发生。非常肥沃的土壤可以提高病毒病的发生率，例如，动物粪肥和几种无机肥料可以提高马铃薯植株的卷叶（leafroll）和皱缩花叶（rugose mosaic）的发病率（Broadbent *et al.*，1952）。一些种类的蚜虫介体在该植物上繁殖很快。植物的营养也可以通过减轻或加重症状的表现而影响病毒侵染的表观量（apparent amount）。

土壤条件对植物病残体中 TMV 的生存有显著影响。潮湿且通气良好的土壤比干燥、紧实或浸水的土壤更有利于病毒的钝化（失活）（Johnson and Ogden，1929）。

土壤温度对于线虫传播病毒也可能有显著的影响。最适的温度和温度范围可能会因

不同的病毒、寄主以及线虫种类而异（Cooper and Harrison，1973；Douthit and McGuire，1975）。然而，尽管在不同季节温度会有所波动，田间线虫的种群可以保持稳定很多年。加拿大的 WSSMV 是由其真菌介体传播的，最佳温度是 10℃（Slykhuis，1974）。这可能是一种地理上的适应，因为来自美国伊利诺伊州（Illinois）的 SBWMV 发生的最适温度约为 16℃。

土壤的物理特性也可能会影响介体的分布，从而影响病毒病的发生率。线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）在前德意志民主共和国的轻松土（light soil）中的十字花科植物上发生严重（Shukla and Schmelzer，1975）。在苏格兰，TRV 侵染发生于自由排水的灰壤（podzols）中种植的马铃薯上，但在过度排水的土壤中的马铃薯上不发生（Cooper，1971）。土壤类型也可能以另外一种方式影响病毒的发生率：保持湿润的程度。例如，在大洋洲的塔斯马尼亚州（Tasmania），BYDV 的侵染在黏重土的牧场上比较严重，可能是因为植物于干旱条件下在这种土壤中生长得更好（Guy，1988）。

5. 天气的季节性变异和流行的发生

甜菜黄化病毒在一年生甜菜上每年的发生情况变化如图 12.23 所示。Watson 和 Heathcote（1965）强调了桃蚜（*M. persicae*）的早期迁移对随后的病毒扩散的重要性。然而，肯定还涉及其他的因素。例如，1945 年，桃蚜在 6 月没有严重发生，然而随后病毒侵染却严重暴发。1946 年 6 月的桃蚜发生是 8 年中最严重的，但是病毒病发生率反而低。在这 8 年期间，附近留种作物的侵染程度几乎肯定是影响病毒发生率的一个主要因素。考虑到病毒接种体的来源相似，像甜菜这样的作物中病毒发生量的季节变化可能是由于天气对蚜虫种群的持续影响，即天气影响介体早期迁移进入作物的时间和侵染范围、在作物上种群的建立以及该种群的迁移率（图 12.23）。

持续的不正常天气条件可能会导致某种在特定地区作物上每年轻度发生的病害的大流行。在 1963 年秋天，加拿大阿尔伯塔省（Alberta）南部 WSMV 大流行的历史说明了所涉及的各种互作。冬小麦通常在 9 月的前两周播种。这个时期播种通常能够使得该作物避免受到正在成熟的春播小麦上病毒的侵染（图 16.5）。在 1963 年出现了不正常的气候条件（Atkinson and Slykhuis，1963），春季降雨明显低于正常水平。春播小麦生长稀疏且种子发芽率低。在 6 月后期情况突然改变，出现了大量降雨。在先前遭受干旱的地区，休眠的春播小麦和大麦的种子推迟了一个月后开始发芽，以前矮化的植株也开始出现大量分蘖。在 6 月和 7 月的降雨量偏高或接近正常水平保证了该作物的旺盛发育，同时由于夏季休耕措施效果的降低，使得大量自生的小麦也生长发育旺盛。在这个春季降雨很少的地区，大面积的小麦和大麦直到 9 月末才成熟。生长发育晚的这些小麦和大麦就成为病毒及其螨类介体的巨大的接种体库源植物。

在 9 月的前两个星期这种正常推荐的时间播种的冬小麦受到了病毒的严重侵染。秋季气象也出现了异常，因而促进了螨类对病毒的大量传播。9 月中旬的平均气温是 62°F（华氏度）（比 30 年平均值高 10°F）。这种异常的高温一直持续到 10 月中下旬。1964 的季节对病毒的传播是不利的，但是，由于在 1963 年霜冻前冬小麦上病毒的广泛传播，大面积的粮食遭到损失。在 1964 年流行暴发的分布情况表明了其与 1963 年春季降雨缺乏的密切关系（Atkinson and Grant，1967）。

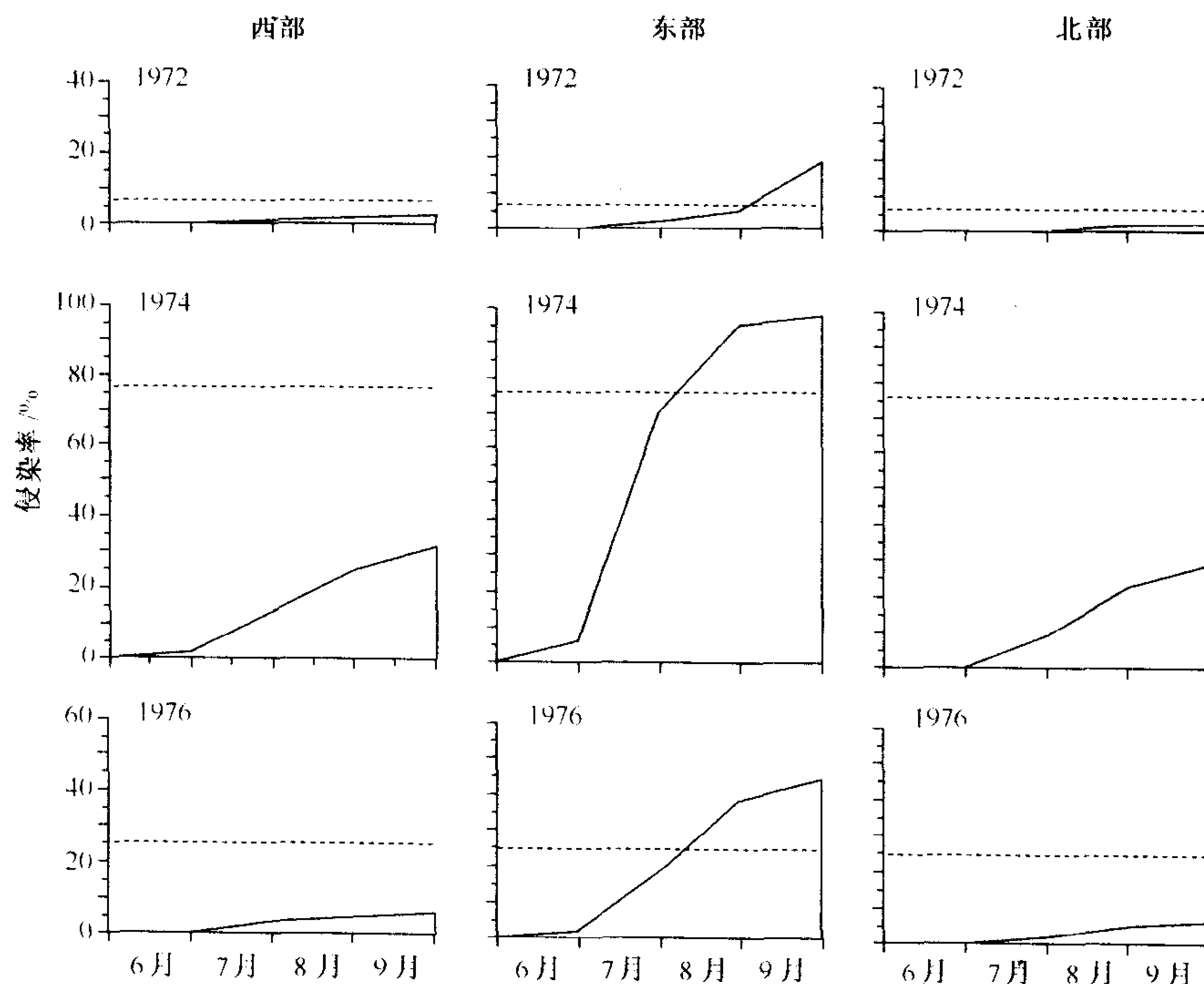


图 12.23 病毒发生率在不同年份和地点的差异。英格兰不同地区甜菜黄化病的月平均发生率在不同年份扩散情况差异很大。G. D. Heathcote（Brooms Barn 实验站）提供了英格兰东部地区（Suffolk、Essex 与 Cambridgeshire）、潮湿地区到西部地区（Shropshire 与 Worcestershire）、偏冷地区到北部地区（Yorkshire）每年 3 月或 4 月种植的代表性作物甜菜的数据，虚线表示通过对整个英格兰甜菜计算得到的 9 月末黄化病的平均发生率。承蒙惠允，引自 Thresh（1983）。

在 20 世纪发生的 3 次马铃薯上 PLRV 的流行持续了 5～10 年，主要发生在北美东部和西欧北部的种子繁育（seed growing）地区。这 3 次高峰的发生年份分别是 1912 年、1944 年和 1976 年，接近每隔两次太阳黑子循环（sunspot cycle）的最小值。干燥温暖的夏季导致了桃蚜（*Myzus persicae*）介体向北方的迁移（Bagnall，1988）。

异常风型（wind pattern）可能作为一个因素导致的病害流行见图 12.17 预测病害暴发的问题将在本节的 D 部分加以讨论。

C. 经过季节周期的存活

病毒能够以各种方式经受寒冷的冬季或干燥的夏季而存活。有些病毒的存活方式不止一种：

（1）许多病毒可以在不同的季节存活于相同的寄主植物或繁殖材料中。它们包括主要存在于多年生寄主、块茎、长匐茎等部位的病毒，以及通过种子传播的病毒。同样地，冬季在田间储存的作物，如莙荙菜（mangold），可以作为病毒和介体二者的来源。

（2）寄主范围广的病毒生存能力更强，因为它们的寄主包括多年生植物、生长季节有重叠的一年生植物或者能够发生种子传播的植物。

(3) 二年生或多年生野生植物、观赏树木、灌木丛或类似车前（*Plantago* spp.）的杂草都可能是许多病毒越冬和越夏的重要来源（Hammond，1982）。

(4) 能够经过叶蝉介体卵传播的病毒可以在该介体的卵式若虫中越冬（图 12.24）。

(5) TMV 和其他一些病毒在合适的条件下可以在病残体中越冬，有时也游离存在于土壤中。TMV 还可以存在于烤烟棚的植株残余物中。过去一直将注意力集中于以自由形式存在的病毒粒体。然而，众所周知，许多侵染脊椎动物的病毒可以吸附于无生命的表面并在此处生存（Gerpa，1984）。因此我们应该把更多的注意力集中于能够吸附在矿物质上的植物病毒的生存状态。Piazzolla 等（1989b）表明 CMV 可以吸附在微晶高岭土（montmorillonite）（一种可膨胀的硅酸盐层）上。在这种状态下，它可抵抗强盐溶液的钝化作用。

(6) 真菌介体的休眠孢子携带的病毒可能会在土壤中长期存活。

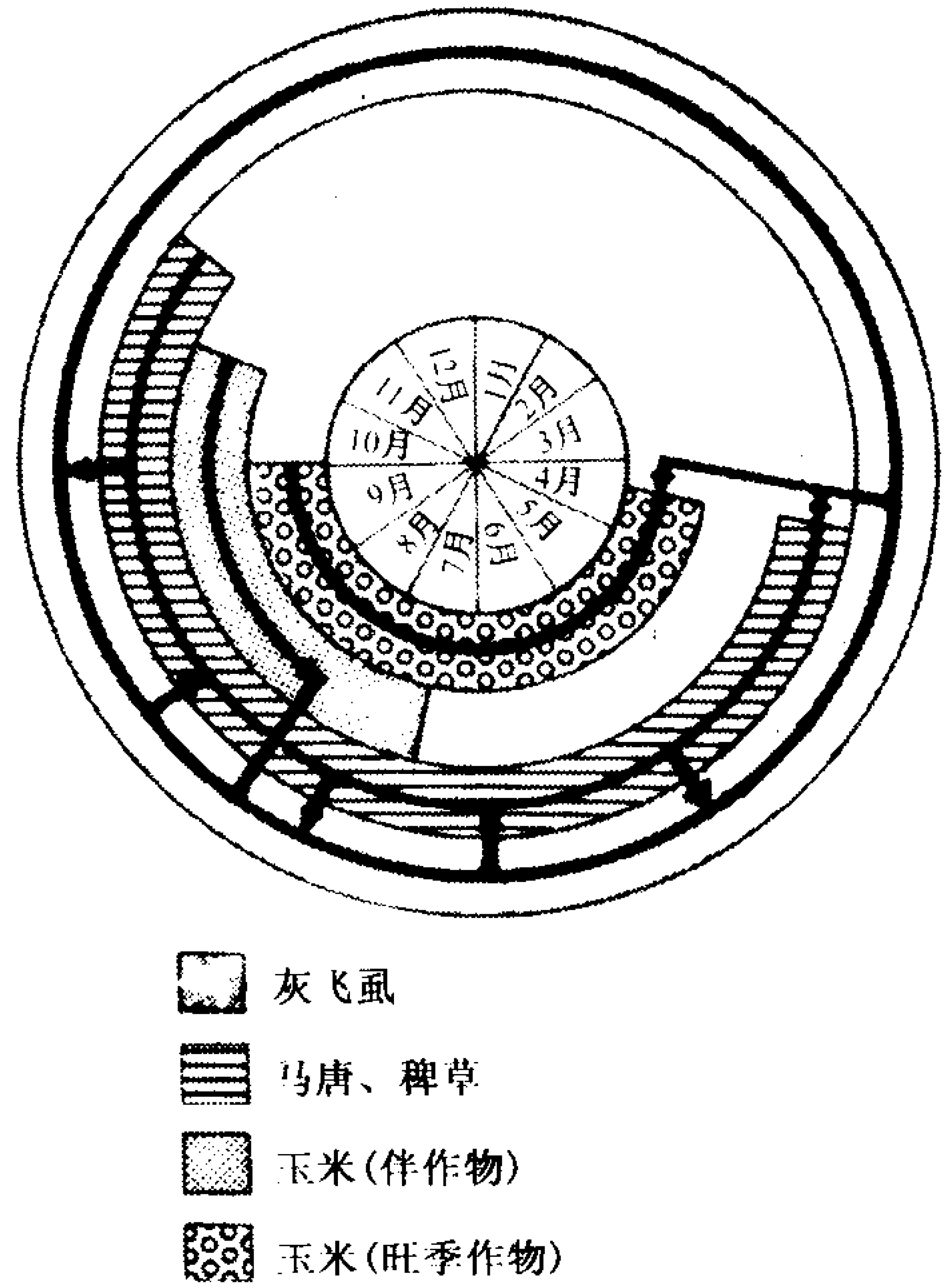


图 12.24 玉米粗缩病毒（MRDV）在意大利北部通过季节循环的存活情况。灰飞虱（*Laodelphax striatellus*）在滞育期（diapause）以若虫形式越冬，在没有植物寄主存在时，该介体可携带病毒越冬。黑线和箭头分别指的是病毒在不同寄主间往返移动的情况。承蒙惠允，引自 Conti（1972）。

(7) 农艺措施可以使病毒在相同的地点连续播种的相同作物上全年存在。这种情况在气候适宜时可能在粮食生产作物上全年均会发生，因为该种类的采种作物（seed crop）在整个冬季都生长，从而在春季和冬季作物都种植在一起的地区，与生产作物（production crop）或小麦有重叠的时期。在欧洲和北美的一些地区，作物的栽培循环为多食性（polyphagous）蚜虫提供了连续的食物来源（图 12.25）。另外一个例子就是英国冬油菜种植量的增加对蔬菜作物造成了威胁，因为在这些油菜中存在着许多种病毒（Walsh and Tomlinson，1985）。

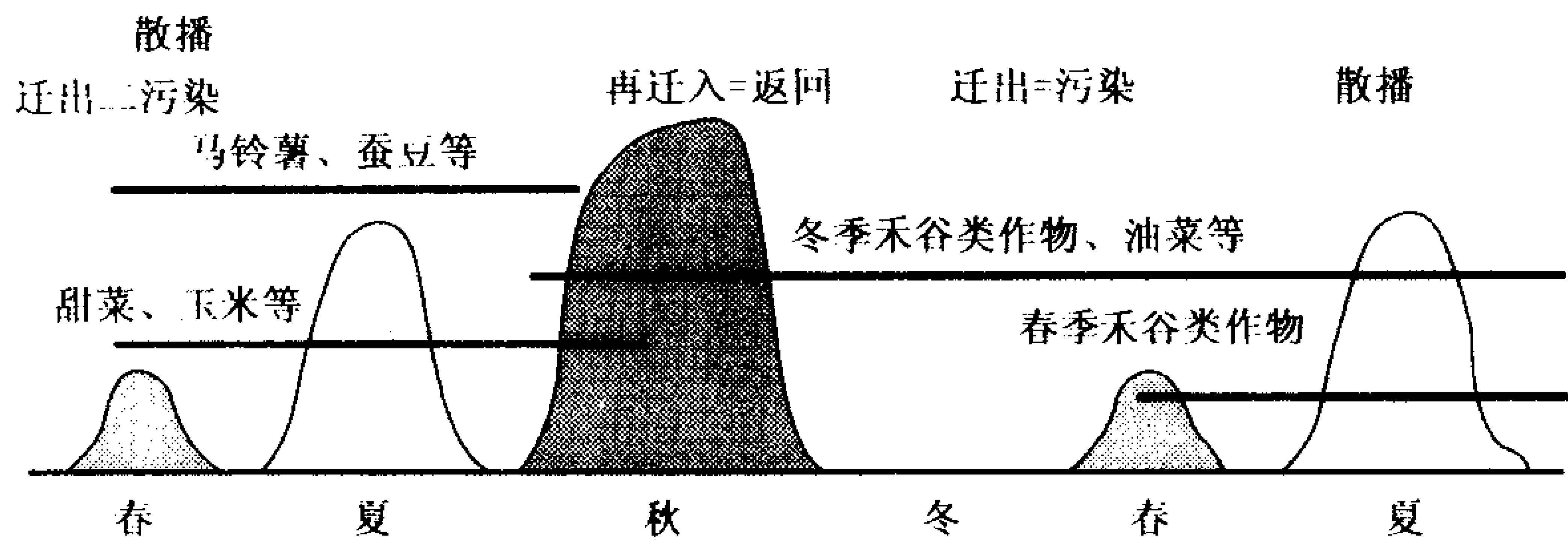


图 12.25 蚜虫迁飞和各种作物耕作期之间的时间关系。承蒙惠允，引自 Robert（1999）。

D. 病害预报

对于主要作物病毒病的流行学和生态学的了解可以用来预测一些潜在的流行。这在病害控制中是很重要的。目前有两种方法可预测及监测病害的发展，并建立数学模型。

1. 监测病毒病的发展

第16章（第Ⅱ节A.1）将讲述对病毒介体的监测从而有效地使用农药。许多大农场主都会监测他们的作物，以便在合适的时间应用防治措施。然而，由于病毒病显症需要数天，甚至数周，基于症状采取防治措施已为时过晚。同时有效的控制也依赖于对病害的正确诊断以及对其传播方式的了解。

2. 数学模型

针对预测病害传播进农田产生后果的数学模型越来越多。它们分为两种类型：预测模型（prediction model）和模拟模型（simulation model）。预测模型是用来预测可能发生的流行，模拟模型是用来帮助理解产生并且控制某一情况所涉及的因素。建立一个模型是为了解决特定的问题的，没有一种一般的模型可以预测所有潜在病毒流行的可能性和后果。在模型建成阶段，应该考虑尽可能多的因素，其中包括对病毒、介体、病毒-介体互作、作物类型以及影响这些生物因素的耕作制度和各种环境因素的了解。一个好的模型可以帮助我们对问题的严重性以及何时、如何去防治做出正确的战略性决策（Jeger and Chan，1995；Irwin，1999）。Chan和Jeger（1994）与Jeger等（1998）描述了一种建立在病毒的节肢动物介体的传播特点的模型，用来分析铲除病株及通过杀虫剂降低介体种群的影响。根据这个模型，他们指出铲除病株在种群密度低时只对非持久性传播的病毒有效，而在种群密度高时，又只对增殖型病毒有效。降低介体的种群密度对于持久性增殖型病毒的控制是有利的，而对非持久性病毒的控制是不利的。同样地，已经有一种模型用于分析病毒介体互作对植物病毒病流行的潜在影响（Madden *et al.*，2000）。

对于特定的病害情形有多种模型，以下举几个例子：

（1）预测采用健康的和被侵染的木薯切块（cutting）对ACMV传播的影响（Holt *et al.*，1997）。假如木薯切块没有病毒，那么大量的粉虱介体种群的高效传播可以导致病害循环持续发生。假如一些木薯切块是被侵染的，那么这个模型预测了3种可能的结果：病害消失、健康和被侵染植株的同时存在或所有植株均受到侵染（这都依赖于不同的参数）。

（2）预测英国甜菜黄化病毒病的模型的建立是基于前一个冬季的气候（特别是霜冻的天数）（Watson *et al.*，1975）［图12.26（A）］、蚜虫介体春季开始迁移的日期（Harrington *et al.*，1989）［图12.26（B）］以及种植甜菜的地区（东部、西部与北部地区）。这个模型已经得到改进，可以分析迁移的桃蚜（*Myzus persicae*）这个主要介体的数目（Werker *et al.*，1998）。

（3）建立在介体对健康植株及受到BYDV侵染的植株的选择性模型表明，介体对病株的偏好依赖于病株群体的大小（McElhany *et al.*，1995）。介体的偏好依赖于病毒在介体中的持续性。将分析的结果与介体对病株的偏好从而导致病害的扩散这个假设进行对比。

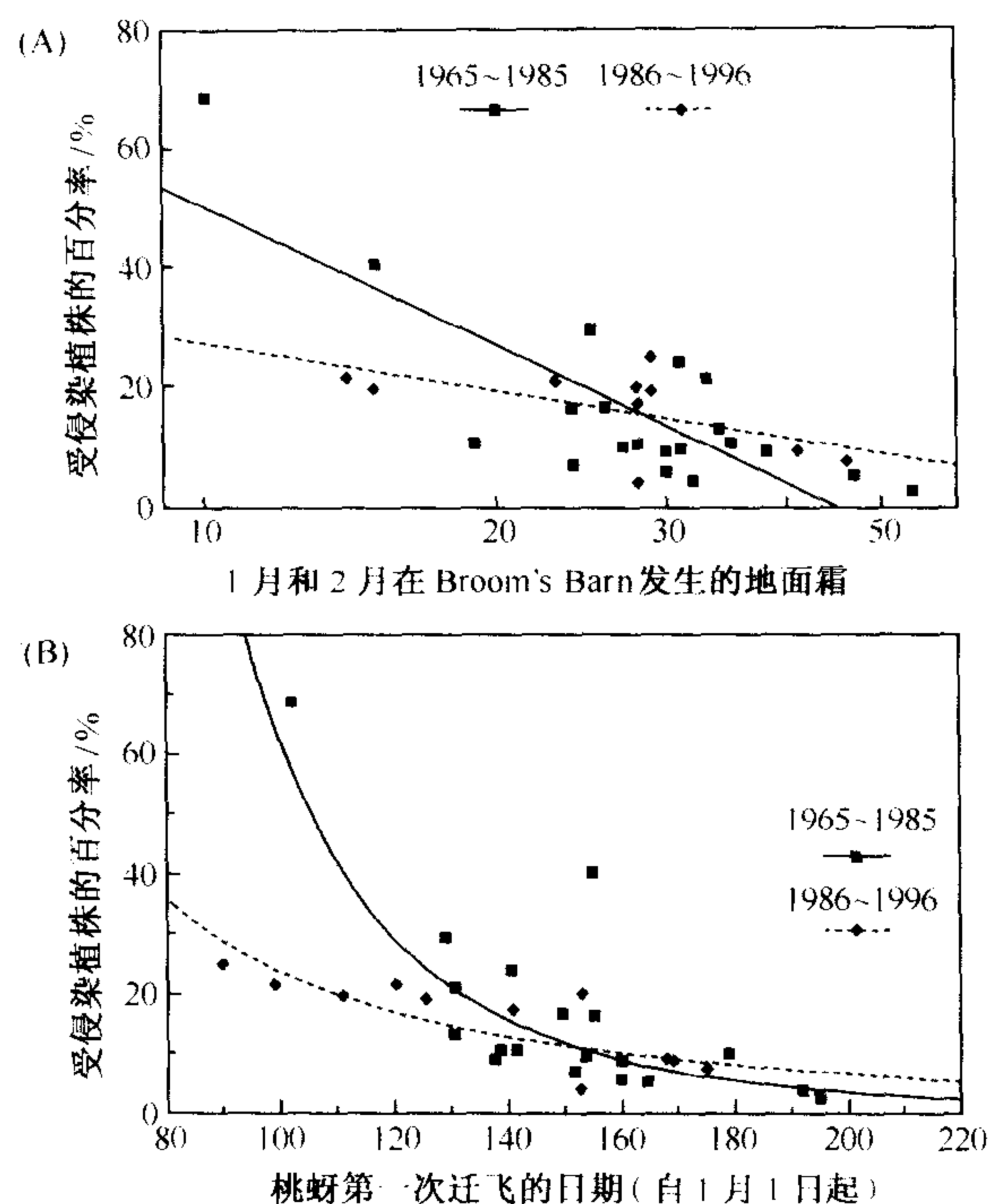


图 12.26 用于预测在英格兰发生甜菜病毒性黄化病的影响因素。(A) 1965~1996 年英国东部地区冬季气候对甜菜黄化病毒发生的影响。在位于英格兰东部的 Broom's Barn 实验站测量的 1 月和 2 月的地面霜。(B) 1965~1996 年蚜虫迁移与英国东部地区甜菜病毒性黄化发病率之间的关系。承蒙惠允，引自 Dewar 和 Smith (1999)。

(4) 为了研究病毒间的竞争产生的影响，Power (1996) 分析了 BYDV-MAV 和 BYDV-PAV 之间的互作。传播率对病毒间竞争的后果有重要的作用，正像传播和介体行为方式的互作。

(5) 许多热带地区的一年生作物连续栽培，没有季节的间断。Holt 和 Chancellor (1997) 针对这种情况提出了一种模型。这个模型预测了在特定的地区发病率依赖于侵染的效率、扩散梯度以及种植日期的变化。这个模型用来讨论与水稻东格鲁病毒病的传播相关的情况。

上述例子表明在建立有意义的模型的过程中需要考虑一些复杂性 (complexity)。因此，有必要分析寄主植物以及介体与其寄主的时间动力学和空间模式 (Real and McElhany, 1996; Perry, 1998; Raybould *et al.*, 1999)。空间模式应该是大规模的，同时要考虑到地形的生态学 (Barnes *et al.*, 1999)。

E. 结论

从上述的介绍可以看出参与作物中病毒的生态学和流行学的因素和互作是极其复杂的。这可以通过黄症病毒科病毒在作物内与作物间传播的过程来表现 (图 12.27)。黄症病毒科是流行学研究最多的病毒组群之一，但是图 12.27 的复杂性也适用于其他作物的情形。至今还没有关于病毒在非作物自然系统中的流行学数据。

图 12.27　黄症病毒科病毒传播的流行过程表明了不同的侵染途径以及马铃薯和其他作物之间的相关差异。承蒙惠允，引自 Robert（1999）。

我们可以看出不是所有的病毒都具有一切适合生存和传播的特性。每个病毒都是一些特性的结合体从而使得它能或多或少有效地存在着。TMV 没有重要的无脊椎动物介体，但是它能够抗失活，在寄主中能够以高浓度存在，机械接种很容易而且寄主范围广。相比之下，在昆虫介体中复制然后通过卵进行传播的病毒是利用另一种方式在植物寄主中生存。

TSWV 是一种非常不稳定但在田间却能够成功生存的病毒。在正常条件下它的侵染性在体外只能保持几个小时。它有特定的介体（一种只能在幼虫期获取病毒的蓟马），而且在全世界广为分布。它之所以能够稳定存在可能是由于以下几个因素（Best，1968）：①寄主范围广，其中包括许多多年生不产生症状的寄主，成为持久的毒源；②能够传播病毒的蓟马种类分布广泛；③株系存在较多，从而产生重组或基因重配使得病毒能够快速地适应新寄主，产生相当轻微的症状。

许多线虫传播的病毒也能通过杂草及作物寄主的种子传播。受侵染的种苗一般看起来是健康的。线虫传播和种传的结合可能对许多病毒的生存和散布有重要作用（Murant and Lister，1967）。受侵染杂草种子的发芽可能会引起田间线虫种群的再侵染，同时带毒的种子传播的距离要比线虫远，从而可建立新的侵染中心。Murant 和 Lister 指出像 TBRV 这样可以在土壤中的杂草种子中存在的病毒，在它们的介体逸去长针线虫（*Longidorus elongatus*）中持留的时间不会超过 9 周。相比之下，两种线虫传多面体病毒属病毒（ArMV 和 GFLV）能够在剑线虫属介体中存在长达 8 个月，但是从未或很少在受侵染的土壤中的种子中发现。

病毒在完全自然或几乎自然的生境中存在，关于它们的生态学的研究很少。我们所知道的也只是在研究有重要经济意义的病害时所做的一些调查。在未受到人类干扰的自然选择长期作用于病毒和寄主基因型的条件下，病毒可能会紧密地适应于它们的植物寄主和无脊椎动物或其他介体。病毒侵染对植物生长的影响就会降到最低。在个别植物上偶尔会有严重的症状，但是造成流行的可能性是很小的。

数项研究表明在野生植物上，一般侵染后都不会产生症状。因此，CMV 在英国（Tomlinson *et al*.，1970）和前德意志民主共和国（Shukla and Schmelzer，1973）的杂草寄主在受侵染后都没有症状产生。

病毒和寄主的基因型之间可能存在区域的适应性，使其产生较轻的症状。Tomlinson 和 Walker（1973）发现从英国、北美和澳大利亚获得种子而种植的繁缕（*Stelaria media*）感染 CMV 的程度要比本国来源的种子轻很多。因此，很可能发生了对病毒的株系和该植物的耐病变种的自然选择。

一种西番莲上的病毒能够引起象牙海岸引进的西番莲（*Passiflora edulis*）的病害，然而，在该国的偏远地区侵染当地的蒴莲属植物（*Adenia* spp.）却不显症（De Wijs，1975）。另一方面，集约农业可能会引起附近的野生植物区域复杂生态系统的改变。这种变化可以引起野生植物中致病力更强的病毒株系的产生，如加利福尼亚的 BCTV（Magyarosy and Duffus，1977）。

农业措施，甚至是在相当原始的阶段，的确已经在某些方面改变了病毒的生存环境。

（1）植物的选择和以后的育种产生了对已经存在的病毒有不同反应的新的寄主基因型。

（2）栽培措施使新的植物群体产生，包括有用的植物和杂草。

（3）这些农作物群体在世界范围内运输，从而能够毗邻自然种群，在自然种群中存在的病毒可以进入农作物。

（4）伴随着植物的运输，昆虫介体和潜在的介体也进入新的地区。已经存在的昆虫可以传播到农作物上。

（5）大范围种植单一种主要植物可能会促进昆虫介体的种群数的增加，从而导致病害的大面积暴发。在同一个地点全年种植特定的种会使这种可能性增加（如种植如甜菜这样的二年生采种作物），引入携带病毒的杂草也会产生同样的效果。

（6）类似耕作和排水这样的农业措施可能会改变土壤的条件从而明显地影响寄居于土壤的病毒介体的种群。

（7）嫁接除了能够传播病毒外，还可能通过选择病毒株系和将病毒引进以前未侵染的种类从而产生新的病害。

一些农业措施可能会导致对病毒的弱株系无意识的选择，但是，一般来说，上述的因素不断地以不同的方式结合从而产生新的不稳定的生态型，使得病害能够在农业和园艺作物上暴发。另一方面，一些地区在适合病毒侵染的条件下长期种植一种作物，可能会产生抗性植株而不需要人为的选择。例如，许多来自于埃塞俄比亚高原上的大麦品种对 BYDV 和 BSMV 有高度的抗性（Harlan，1976），这可能是由于大麦在这个地区已经种植了数千年的缘故。

第 13 章　植物病毒功能的新发现

第Ⅰ节　导言

在前面章节中多次出现的两个方面的描述为病毒的特征与功能的整合以及病毒、它们的寄主和传播介体之间的互作。对后者的描述见图 13.1 中的解释。

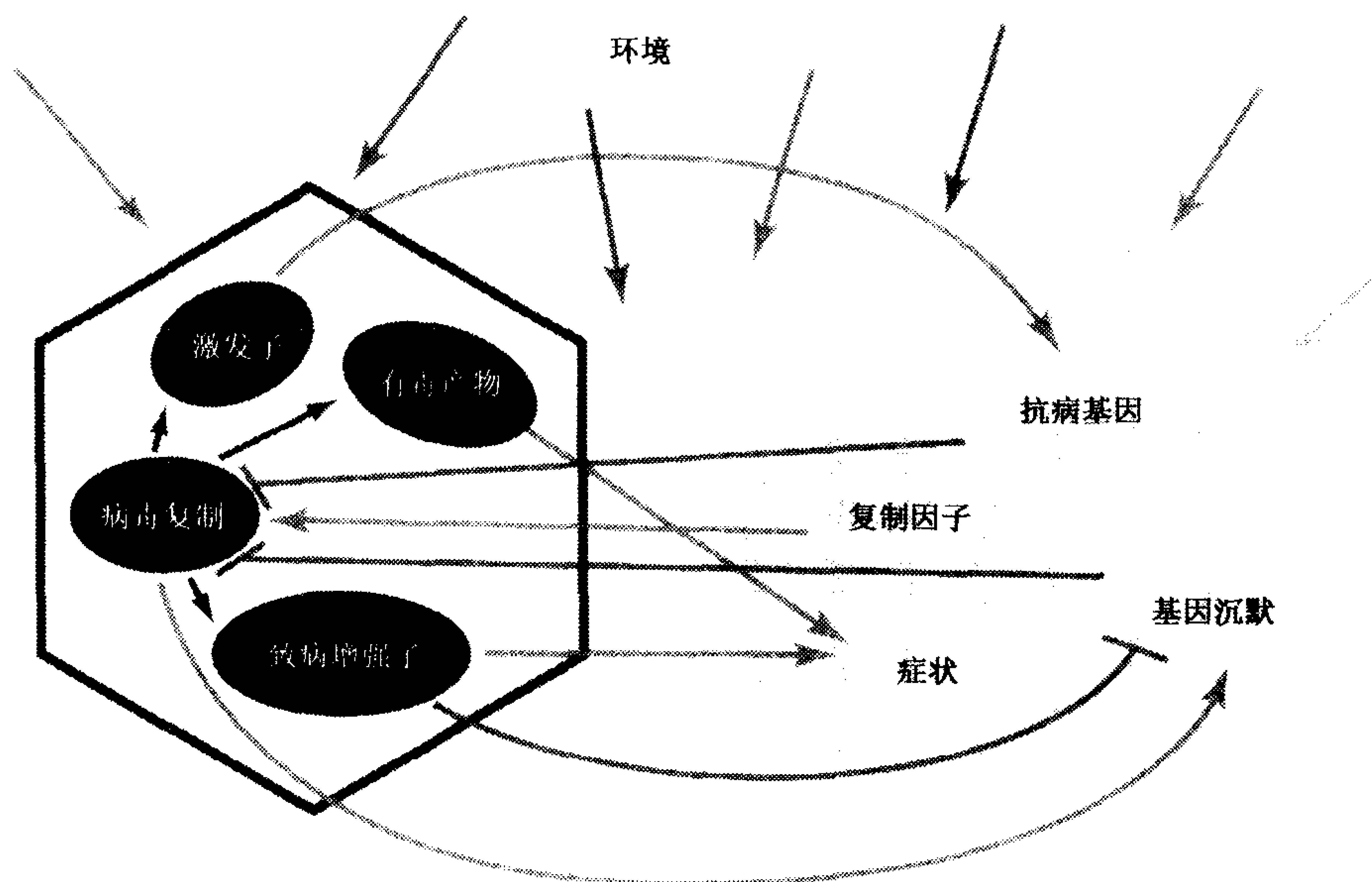


图 13.1　（见彩色图版 13.1）本图说明病毒侵染是侵袭、防卫与对抗防卫的综合结果。病毒方面在左边用棕色表示，而植物方面在一边用绿色表示。承蒙 J. A. Garcia 博士同意采用。

在这些领域中，对有关病毒的知识和一些机制的理解，在今后几年可能会得到深化。在本章第一部分，为强调植物病毒的形式和功能，将前面数章的一些线索串到了一起。为此，将分析病毒侵染循环（infection cycle）的各个阶段，然而必须记住，这些过程不一定界线分明，而且它们之间有一些互作。正如 Revers 等（1999）所述“几乎可以肯定，我们会发现 RNA 的复制和翻译过程在时间和空间上是统一的”。这一陈述虽然是针对马铃薯 Y 病毒属病毒（potyviruses）的，但是，可以这样说，这种观点即使不适用于所有病毒也会适用于大多数病毒。

在此讨论中，侵染循环被划分为早期事件（进入、脱壳和最初的翻译）、中期事件（翻译和复制）以及晚期事件（细胞间的移动和病毒粒体的装配）3 个过程。由于一些事件在时间上有重叠，并且部分“早期”功能也可能在侵染的晚期发生作用，因此这种划分并非十分正确。然而病毒从最初入侵细胞，至移出该细胞进入临近细胞并形成粒体

有一个自然的进程。因此，为了简化讨论，下面将应用这一武断的划分方法。

多数揭示这些互作所涉及的技术在前面各章中已经做了描述。它们基本上属于体外（*in vitro*）技术，如酵母双杂交系统，告诉你可能会发生什么，而活体（*in vivo*）技术，如利用荧光报道基因（fluorescent reporter）以及共焦显微术（confocal microscopy）可以告诉你在细胞内正在发生着什么事件。

第Ⅱ节　早期事件

在第 7 章中我们讨论了 RNA 病毒的进入、脱壳和基因组 RNA 的初始翻译。TMV 的共翻译解装配（co-translational disassembly）过程产生了病毒基因组复制所必需的 5′端基因产物，这对上述几个事件的整合做了阐释。现已证明，其他病毒，如雀麦花叶病毒属病毒和南方菜豆花叶病毒属病毒也发生共翻译解装配。但是对于依靠蛋白质之间的相互作用来稳定衣壳的等轴球状病毒（如豇豆花叶病毒属病毒）和据认为装配的起点位于基因组 5′端的杆状病毒（如马铃薯 X 病毒属病毒）的解装配机制还不清楚。虽然这不同于 TMV 类型的共翻译解装配机制，但是很可能脱壳和早期翻译是协调一致的。

Zoeten（1995）对病毒的进入和脱壳这些早期事件持有不同的观点。他认为在病毒进入植物细胞的初始阶段，病毒粒体在细胞壁处受到去稳定作用的影响。他的观点基于两个方面的事实，即①对细胞的创伤反应结果是产生了酚类化合物（phenolic compound），这些酚类物质可以抑制病毒；②受伤细胞的胞间连丝的堵塞会阻止病毒向临近细胞移动。因此，他认为病毒在受伤的细胞中是不起作用的，它的成功侵染只能发生在质膜没有受到破坏的细胞中。他的假说认为，细胞溶胶（cytosol）没有为使病毒粒体去稳定提供环境条件，对该植株中其他细胞的侵染是尚未重新稳定的子代病毒行为的结果。使这一观点和另一个更为人们接受的观点难以调和的困难在于其最初的侵染只需要一个有活力的侵染单元（infection unit），而许多病毒粒体会进入该植株内。就目前的技术而言，把起始侵染的病毒粒体和伴其进入的其他粒体区分开来是不可能的。

如第 7 章第Ⅳ节 A 所述，为了提供正链 mRNA，具有负单链 RNA 基因组的病毒必须转录其粒体包裹的 RNA；这一过程是由病毒粒体中的 RdRp（依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶）催化完成的。Jackson 等（1999）已描述过细胞核弹状病毒的脱壳、转录和翻译等各个步骤的途径（参见第 8 章第Ⅴ节 A. 2；图 8. 19）。不过，所涉及的相互作用的细节尚待明确。其他负链 RNA 很可能具有相似的途径。由于这些病毒也侵染昆虫，若能阐明在昆虫和寄主植物中其脱壳、初始转录和翻译之间的相互作用是否相同将是非常有意义的。在动物细胞系统中有更多的关于侵染动物的弹状病毒和布尼亚病毒科病毒的侵染循环的信息，这一系统也可能适用于研究昆虫携带的侵染植物的病毒。可是，在缺乏足够的信息时就把那些侵染动物的病毒的有关知识类推到植物病毒是不明智的。

双链 RNA 病毒侵染植物细胞的早期的信息和上述负义单链 RNA 病毒的情况相似。

在第 8 章（第Ⅶ节 B 和第Ⅷ节）阐述了对经过逆转录阶段的和具有单链 DNA 基因

组的植物病毒复制的理解。就负链和双链 RNA 病毒而言，不同阶段的相互作用的细节尚有许多未知之处。例如，CaMV 如何脱壳现在还不太清楚。由于其外壳蛋白中有一个细胞核定位信号（nuclear localization signal），因此有可能在细胞核中发生脱壳。但是，如第 7 章第Ⅱ节所述，CaMV 粒体特别稳定。

第Ⅲ节　中期事件

中期的主要事件是病毒基因组的完全翻译和复制。就大部分（即使不是全部）病毒而言，寄主在相当程度上参与了这些在时间和空间上密切整合的功能。

A. 寄主和病毒的翻译

植物病毒基因组的表达在第 7 章中已经进行了详述。病毒 mRNA 利用寄主的翻译体系。在某些情况下，有证据表明病毒控制着翻译自身 mRNA 先于翻译至少部分寄主 mRNA 的优先权。对此，最深入的理解是第 9 章（第Ⅲ节 B.3）中提到的马铃薯 Y 病毒属的 PSbMV，该病毒的表达与寄主中各种 mRNA 的表达量相关联，其中一些寄主 mRNA 的表达量减少，一些寄主 mRNA 的表达量增加，而另一些寄主 mRNA 的表达量不变。这反映了病毒控制寄主蛋白质的翻译是为了营造更适合自身生存的细胞环境。病毒影响寄主蛋白质合成的另一种方式是像番茄斑萎病毒属病毒（tospoviruses）和纤细病毒属病毒（tenuiviruses）那样采用“抢帽”（cap-snatching）机制。在侵染脊椎动物的正黏病毒科（*Orthomyxoviridae*）、布尼亚病毒科（*Bunyaviridae*）和沙粒病毒科（*Arenaviridae*）病毒中抢帽子机制也同样存在，据认为通过这种机制病毒 mRNA 获得了先于寄主 mRNA 翻译的优先权。

有机体（无论基于植物或动物细胞还是细菌或病毒）为了正确地行使功能，蛋白质在适当的时间、地点，适量地以适当的形式正确表达是极为重要的。就细胞生物而言，这种控制过程是在从染色体 DNA 上转录 mRNA 的水平上执行的。有些控制如第 7 章（第Ⅴ节 C）所述，是通过结构以及 mRNA 的 5′端和 3′端的相互作用来实现的。对在细胞质中复制和表达的 RNA 病毒而言，最终基因产物表达的控制是通过一系列机制完成的，这在第 7 章（第Ⅴ节 B）已做了说明。这些机制已经得到了进化，它们不仅能克服真核细胞核糖体仅翻译 5′可读框的局限性，而且对最终基因产物在量上和时间上都能给予有效的调节。

B. 寄主和病毒的复制

植物病毒基因组的复制已在第 8 章中详述。寄主中遗传物质的正常复制方式为 DNA→DNA，单链环状 DNA 病毒［双生病毒科（*Geminiviridae*）和矮缩病毒科（*Nanoviridae*）］就利用这一途径。然而，这些病毒必须克服寄主 DNA 的复制仅发生在细胞循环的特定时期（S 期*）这个问题。这些病毒编码一种基因产物，与一种正常的寄主蛋白质相似，它可以把细胞所处的时期从 G 期转变到 S 期**。MSV 的外壳蛋白

* 原文有误，写成“G 期”。

** 原文“从 S 期转变到 G 期”有误——译者。

具有细胞核定位信号，因此其基因组首先移动到细胞核附近。不过，外壳蛋白也和病毒的移动蛋白相互作用，而移动蛋白抑制外壳蛋白与 DNA 形成的复合体转运到细胞核。这使在细胞核新合成的 DNA 趋向于在细胞之间移动。

病毒（花椰菜花叶病毒科）复制的反转录途径（DNA→RNA→DNA）在植物基因组中的反转录因子也采用。借助依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶Ⅱ（DNA-dependent RNA polymeraseⅡ），寄主直接参与病毒 DNA 基因组的转录。但是 RNA→DNA 的反转录过程是由病毒编码的反转录酶催化的，然而，寄主是否直接参与这一过程尚不清楚。

尽管近来在基因沉默方面的工作涉及依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（第 10 章第Ⅳ节），使从 RNA 直接产生 RNA 这一过程并不像原来想像的那样罕见，但是在正常的植物细胞中毕竟还是不常见的。正如第 8 章（第Ⅳ节 E.5，F.1 和 H.5 部分）描述的那样，寄主蛋白质也参与了 RNA 病毒的复制复合体。应该特别注意的是，其中一些寄主蛋白质是翻译起始因子，这可能意味着翻译和复制可以同时进行。由于两个过程在模板上需沿着不同的方向移动，因此推测它们（和其他寄主蛋白质一起）可以避免两个过程的相互干扰（第 8 章第Ⅳ节 M）。

C. 病毒表达和复制中的空间因素

越来越多的证据表明，植物病毒的表达和复制发生在植物细胞内的特定位点，并且这些位点和膜系统以及细胞骨架因子（cytoskeletal element）相关。动物病毒也是如此（Ploubidou and Way，2001）。

1. 植物内膜（endomembrane）与细胞骨架系统

虽然还不清楚病毒进入细胞和共翻译解装配这些早期事件与植物内膜以及细胞骨架系统是否有关系，但是共翻译解装配发生在含有合成蛋白质的核糖体的粗糙内质网上是可能的。日益增多的证据表明，病毒侵染循环的多数中期事件与内膜系统以及细胞骨架（cytoskeleton）有关，因此对这些结构有一个总的了解是必要的。

a. 内质网

内质网（endoplasmic reticulum，ER）系统是存在于所有真核细胞中的多形的（pleomorphic）、多功能的细胞器（organelle），它为大量的膜表面提供了不同的功能域（functional domain）（Staehelin，1997）。迄今至少已经鉴别了 16 种类型的内质网域（ER domain）（图 13.2）。

目前认为其中的 7 种内质网域有的能够、有的可能与植物病毒相互作用。将来很可能会发现病毒与其他内质网域的相互作用。

核被膜（nuclear envelope）的外膜是和内质网相连的，并且有核糖体与膜结合。核的外膜与内膜在核膜孔复合体处相连接。核膜孔复合体（图 13.2 ②）介导蛋白质与核酸在细胞核与细胞质之间的定向转运（directed transport）。虽然在生化与分子方面我们对植物的核膜孔所知甚少，但是与其他研究较透彻的真核生物的核膜孔结构比较，相信它们具有某些独特的结构特征（Panté and Aebi，1994；Heese-Peck and Raikhel，1998）。如第 8 章（第Ⅴ节、第Ⅶ节与第Ⅷ节）所述，DNA 病毒（caulimoviruses、geminiviruses 和 nanoviruses）与细胞核弹状病毒属病毒（nucleorhabdoviruses）的基因

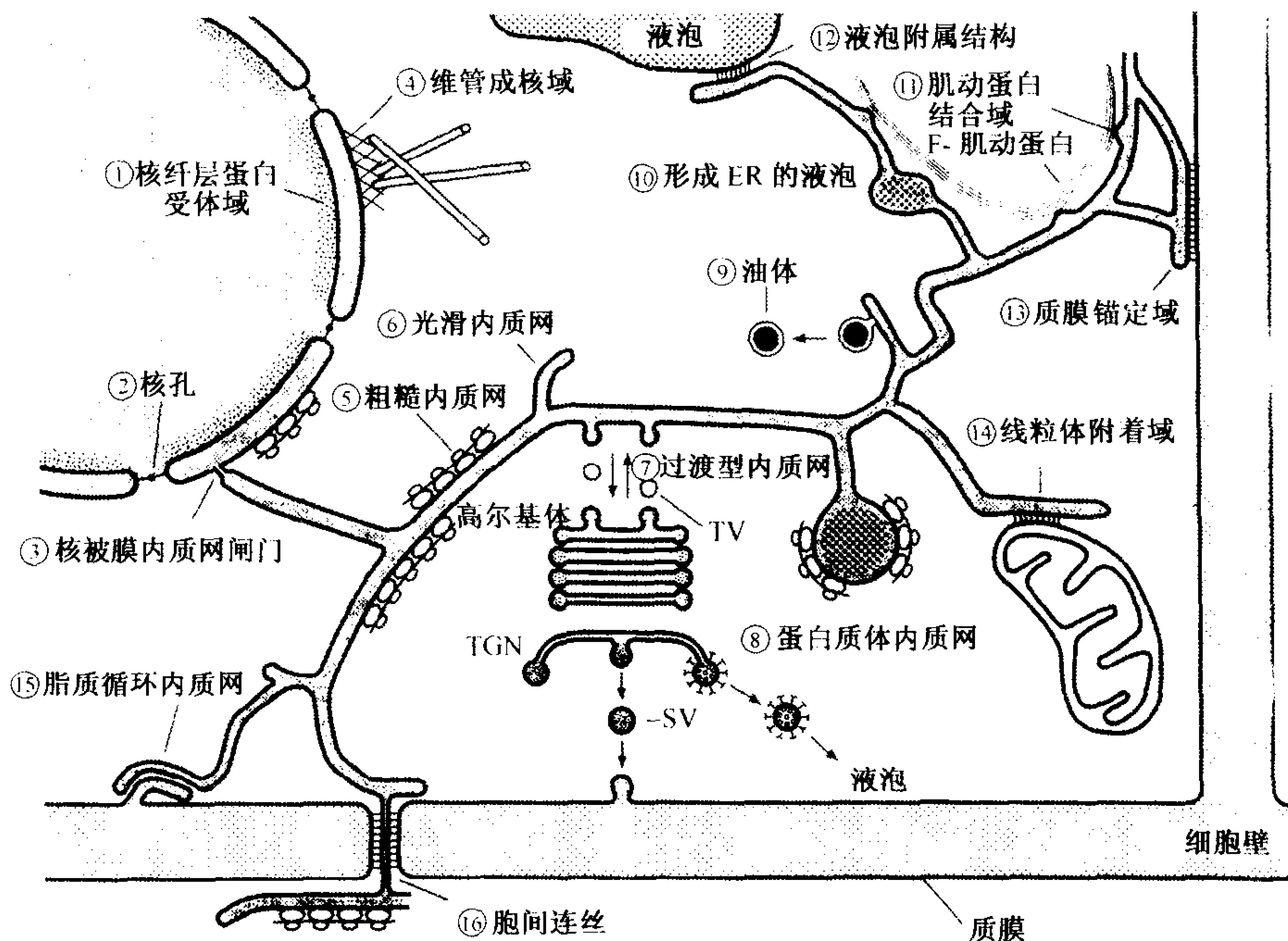


图 13.2 植物细胞的示意图，表现了16个类型的内质网（ER）域。TV，转运小泡；SV，分泌小泡；TGN，跨高尔基体网络。承蒙版权所有者© Blackwell Science Ltd. 惠允，引自 Staehelin（1977）。

组向细胞核运输是它们复制循环的重要组成部分；在其中一些病毒的蛋白质中已经鉴定出了核定位信号（第9章第Ⅱ节C）。在细胞核中，也发现了正链RNA基因组的病毒粒体。

在植物细胞中，其核被膜的外层也是主要的微管组织中心（microtubule organizing center，MTOC)(图13.2④)。有关微管的知识将在下一部分加以讨论（第Ⅲ节C.1.b)。

粗糙内质网和光滑内质网是内质网的两种经典类型，它们的区别在于其上面是否附有核糖体。粗糙内质网是mRNA翻译蛋白质的场所。有人认为，粗糙内质网和光滑管状内质网（图13.2⑤⑥）之间的可逆转换可能是由于结合了新的多聚核糖体（polysome）或者是丧失了旧的多聚核糖体的结果（Knebel *et al.*，1990）；不过管状内质网的产生和维持也需要有功能的细胞骨架（Quader，1990）。从脊椎动物细胞中光滑内质网的功能类推，植物中光滑内质网的主要功能之一可能是合成膜脂（membrane lipid)。

如第8章（第Ⅴ节B）所述，尽管番茄斑萎病毒属病毒（tospoviruses）基因组的复制和表达发生在细胞质中，但是该属病毒的包膜是通过芽生进入高尔基潴泡（Golgi cisternae）而获得的。蛋白质从内质网到高尔基体的运输是借助于过渡性内质网产生的转运小泡（vesicle）来完成的（图13.2⑦)。

内质网网络对细胞松弛素D（cytochalasin D）的敏感性表示其移动和分布是依赖于基于肌动肌球蛋白（actinomyosin）的流动性（mobility）系统（Liebe and Quader，1994)。在动物细胞中，有令人信服的证据表明微管和动力蛋白（motor protein）与这种流动性有关，并且对肌动蛋白（actin）的依赖是间接的。植物细胞中，内质网和肌动

蛋白丝（actin filament）之间的关系上也有一些电子显微镜方面的微观证据，暗示存在着与肌动蛋白结合的域（图 13.2 ⑪）。在第Ⅲ节 C.1.b 部分将对肌动蛋白微丝（actin microfilament）进一步加以讨论。

与病毒相连的内质网第 7 个域是内质网穿过胞间连丝的部分（图 13.2⑯）。位于胞间连丝中的内质网的中心管状圆柱体部分称为“链管”（desmotubule）或者“紧束内质网”（appressed ER），如图 9.3 所示。

b. 细胞骨架

植物细胞骨架的两个主要组成因子是微管和微丝（microfilament）。为了应答细胞内（intracellular）和细胞外（extracellular）的信号，它们之间存在着动态的相互作用（Baluška *et al.*，2001）。

微管是由微管蛋白（tubulin）构成的，近年来，已经确认了 7 个不同的族（Oakley，2000；Dutcher，2001）。其中量最大的是 α 和 β 微管蛋白，它们形成 α/β 二聚体，进而作为构建微管的单体。有花植物（flowering plant）中包含有多拷贝的 α 和 β 微管蛋白的功能基因，其产物可在翻译后加以修饰，结果产生一系列的同种型（isoform）（Ludueña，1998）。在植物细胞中，已发现 γ 微管蛋白与微管的阵列以及 MTOC 相联系，这种情况与在动物细胞和真菌细胞中一样。其他微管蛋白像 δ、ε、ζ 和 η 近来在动物和真菌细胞中已经被确认，但在植物细胞中尚未发现。目前认为不同的微管蛋白有截然不同的作用，这与其在细胞中的位置以及微管的动态行为有关。

微管结合蛋白（microtubule-associated protein，MAP）是特异性蛋白质，其中有些是机械化学发动蛋白（mechanochemical motor），它们驱动不同的组分沿微管移动。其他的微管结合蛋白调节微管在微管组织中心（MTOC）的装配和在其末端的解装配（图 13.2④）。这就构成了一个“踏车”（treadmill），它驱动微管结合蛋白从 MTOC 端向其尾端移动（有关微管末端动力学的综述见 Schroeder，2001）。这些作用可能和胞质环流以及胞内的分子与大分子的运输有关。在处于分裂间期（interphase）的细胞中，微管的排列包含这样一种方式，即微管被微管结合蛋白（MAP）纵向连接到原生质膜上。Lloyd 和 Hussey（2001）就植物的微管结合蛋白做了综述。

微丝主要是由肌动蛋白组成的，为一种球状单位（G 肌动蛋白）的螺旋状装配体，形成绳索状的纤丝（F 肌动蛋白）。内膜系统周围是一种细胞骨架鞘，它的主要组分是 F 肌动蛋白（Reuzeau *et al.*，1997）。这种内膜鞘（endomembrane sheath）可将其基本结构以及结构动态性赋予内质网，因此它可能是基本架构（framework），在其内部或表面上，细胞中的许多代谢反应有组织地进行着。该鞘通过各种分子把内质网连接到各式各样的细胞器，如质膜（plasma membrane）上。肌动蛋白和胞间连丝相结合，因此可能参与了大小排阻限（size exclusion limit）的调节（White *et al.*，1994）。

已经发现许多其他的蛋白质与植物的细胞骨架有联系。类似肌球蛋白的蛋白质和内质网共定位，可能以膜结合动力蛋白（motor protein）的方式发挥作用，此类蛋白质能使细胞器和内质网沿着肌动蛋白丝移位（Liebe and Quader，1994）。在胞间连丝中也发现了另一种类似肌球蛋白的蛋白质，使用肌动蛋白-肌球蛋白活性的抑制剂［丁二酮一肟（2，3-butane-dione monoxime）］可以导致胞间连丝的颈口区域产生强烈的收缩作用（Radford and White，1998）。一种结合钙的（calcium-binding）与中心体蛋白（centrin）

类似的可收缩蛋白（contractile protein）也定位于胞间连丝（Blackman *et al.*，1999）。这种与中心体蛋白类似的蛋白质可能是钙敏感性、位于胞间连丝的颈口区域并且可收缩的微丝的一个组分。

蛋白质翻译因子 EF-1 和翻译起始因子（iso）4F 与微管蛋白相结合，并且与微管也相连（Hugdhal *et al.*，1995；Moore and Cyr，2000）。现在发现热激蛋白 HSP90 也与微管有联系，在一些病毒如长线病毒属病毒（closteroviruses）中存在着 HSP90 的同源物（homolog）（Freudenrich and Nick，1998）。

2. 细胞骨架与大分子的运动

越来越多的证据表明，无论胞内还是胞外的大分子的运动都与细胞骨架和内膜系统有关。在某些类型的动物细胞如卵母细胞（oocyte）和神经元（neuron）中，微管参与了 mRNA 的长距离运输（Bassell *et al.*，1994a）。在其他类型的动物细胞如成纤维细胞（fibroblast）中，mRNA 的长距离运输和肌动蛋白丝有关（Bassell *et al.*，1994b）。因此，总的结论是：细胞骨架因子在 mRNA 的调节、运动和定位中起着主要的作用（Bassell and Singer，1997）。这种情况也可能存在于植物细胞中，但是，目前尚缺乏足够的证据。

除了上述细胞骨架因子参与蛋白质的移动外，与细胞骨架相关的蛋白移动的其他机制也有报道。例如，由分子伴侣（chaperone）热激蛋白 HSP90、HSP70 和其他蛋白质组成的蛋白质复合体参与了沿着微管的信号传递（signaling）及其他蛋白质的定向移动（Pratt *et al.*，2001）。

D. 植物病毒与细胞骨架因子

越来越多的研究结果表明，植物 RNA 病毒的复制与胞内的膜系统有关（表 8.4）。但是，具体是与膜本身还是与相关的细胞骨架因子有关尚不清楚。对此最详细的研究已经针对 TMV 展开。

Más 和 Beachy（1999）的研究建立了一个在复制期间 TMV 与内质网和细胞骨架因子的结构相关联的模式图（图 13.3）。

用原位杂交技术定位 TMV 的病毒 RNA（vRNA）；用免疫染色定位内质网内腔（luminal）结合蛋白（BiP）、微管蛋白、肌动蛋白、TMV 的复制酶（126/183 kDa）、细胞骨架解聚剂（oryzalin 用于微管，细胞松弛素 D 用于肌动蛋白微丝）；用 GFP 标记 TMV 的 30 kDa 移动蛋白，结合共焦显微术（confocal microscopy），Más 和 Beachy（1999）研究了 TMV 侵染烟草原生质过程中在空间和时间上的变化。最早的事件之一是 vRNA 先与细胞骨架和内质网发生联系，这说明 vRNA 是通过微管运输到核周位置的（图 13.3①）。TMV RNA 的正链和负链在核周的共同存在意味着病毒的复制在此进行。然而，该区域明显被区室化了，这种情况说明它们的合成可能需要不同类型的因子或者分子间的相互作用。移动蛋白是在核周区域合成的（图 13.3②）。

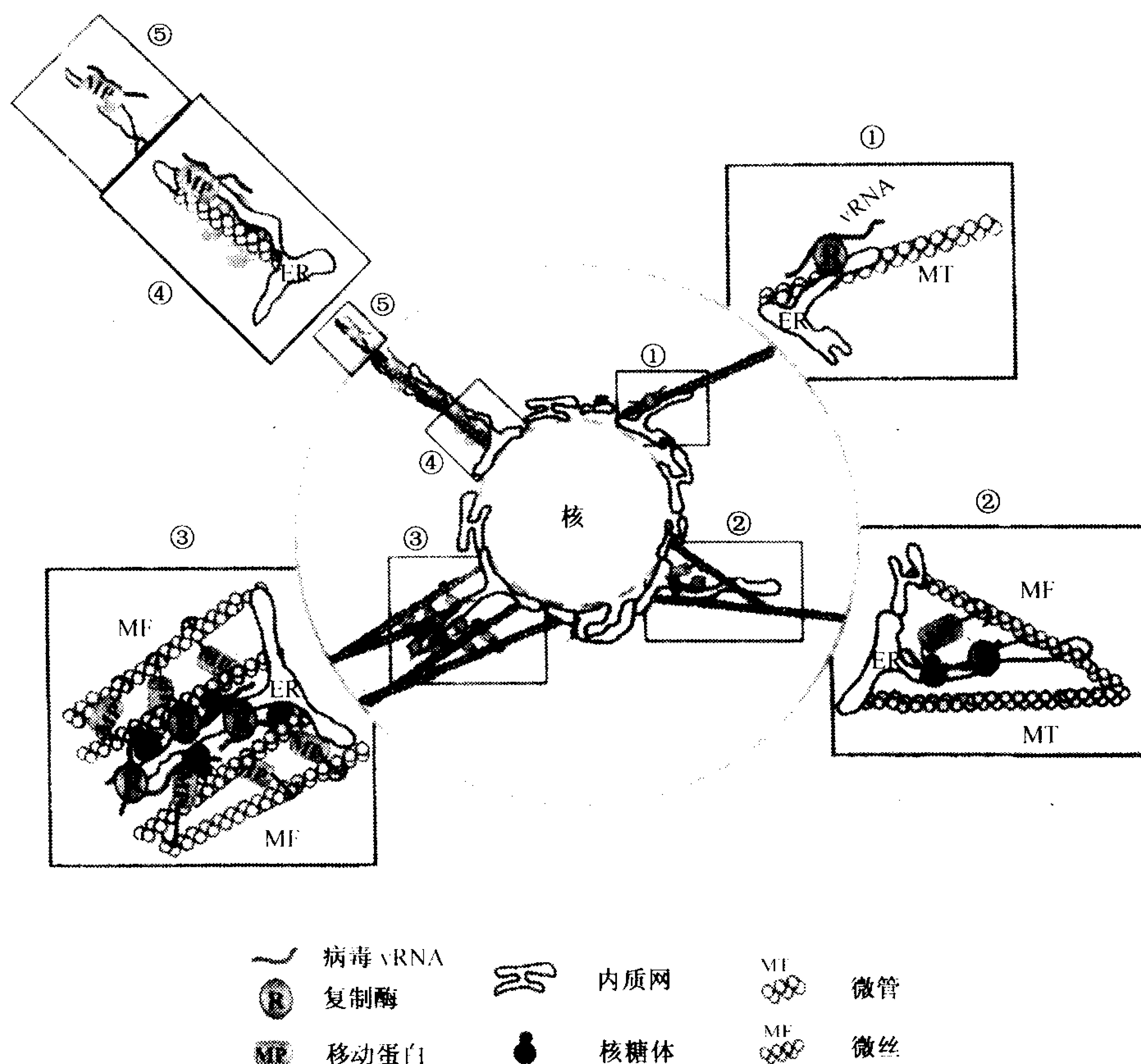


图 13.3 （见彩色图版 13.2）TMV 侵染烟草 BY2 原生质体的模型。① 在侵染早期，TMV vRNA 与内质网（ER）膜密切接触，与 ER 相连的 vRNA-复制酶复合物经微管转运到核周处。②新生的 vRNA 合成移动蛋白，并与 vRNA 相连。③含有移动蛋白、复制酶与 vRNA 的、源自大型 ER 的结构的形成与固定，该结构因受到移动蛋白与微丝互作而保持稳定。④基于微管的 vRNA-移动蛋白复合物转运体系向细胞周边移动以便起始细胞间的移动。⑤含有 vRNA-移动蛋白复合物的 ER 通过质膜向细胞外突出。该模型未按比例绘制。承蒙版权所有者© Rockefeller University Press 惠允，引自 Más 和 Beachy（1999）。

第Ⅳ节 晚期事件

病毒复制的晚期事件主要有两个：①侵染临近细胞的细胞间移动；②为新合成的病毒基因组包裹上外壳。在第 5 章和第 9 章已分别对病毒粒体的装配和病毒的细胞间移动做了阐述。与中期事件相似，有关晚期事件的详细的研究也是以 TMV 为材料进行的。

在上一节提及的 Más 和 Beachy（1999）的研究结果可以扩展到病毒复制复合体从核周向胞间连丝的细胞内移动。核周复制位点可以发展成大型的源于内质网的结构，包含着 vRNA、复制酶和移动蛋白，并且该结构可能通过移动蛋白和微丝的相互作用而得

到稳定（图 13.3 ③）。这些结构和先前提到的病毒质或者无定形内含体有相似之处（Martelli and Russo，1977）。vRNA 和移动蛋白复合体通过基于微管的运输系统运到细胞的周边（图 13.3 ④）。TMV 的移动蛋白具有一段保守序列，该序列亦存在于微管蛋白的一个区域，它可能介导微管原纤丝（protofilament）之间侧边的相互作用（Boyko *et al.*，2000b）。对该模体（motif）的点突变会影响移动蛋白和微管的联系，这可能意味着其移动模拟了微管蛋白装配表面，能够使带有 vRNA 的复合体沿着微纤丝"脚踏轧机"运动。在缺少胞间连丝的原生质体中的最后阶段是含有 vRNA 与移动蛋白的内质网穿过细胞膜向外突出（图 13.3 ⑤）。尚不清楚这些突出物是代表了链管还是其他结构。vRNA、移动蛋白、内质网和微管复合体准确地向胞间连丝移动以及 vRNA 通过胞间连丝的细节也不清楚。肌动蛋白微丝延伸穿过胞间连丝（White *et al.*，1994），而微管看来并非如此，这也许有着重要意义。

复制的最终产物将进入两条途径之一。一条途径是侵染单元（infection unit）转移到临近细胞中继续起始侵染；另一条途径是子代病毒基因组通过包裹（encapsidation）产生病毒粒体。衣壳为病毒向其他寄主传播以及为系统扩展的病毒基因组提供了保护作用（尤其是长距离传播的病毒）。它也有把病毒基因组和植物细胞的复制与翻译机制隔离起来的作用，这样可以限制病毒破坏性的大量增殖。目前对控制后代进入这两条途径的一些因子还不了解。

第Ⅴ节　与植物的系统性互作

第 9 章和第 10 章已分别就病毒在植物中的系统性移动和导致症状的因子做了阐述。在考虑病毒复制与从最初侵染的细胞移动出来的结果之间的相互作用和协同作用时，必须记住以下 3 点：

第一，植物中存在着一种普遍性的防卫系统，它可识别"外来的"核酸（第 10 章第Ⅳ节）。这种系统受双链 RNA 的激活，因此 RNA 病毒的复制可能会激活这一途径。如第 10 章（第Ⅳ节 H）所述，已经证明一些病毒具有抑制或破坏这一系统的机制。这样，系统侵染和对单个细胞的侵染能否成功取决于这一防卫系统与抑制系统之间的平衡。因此在系统侵染中，人们应对病毒与寄主细胞、而非整个植株基础上的相互作用加以注意。

第二，除了上述普遍性的防卫系统外，许多植物具有某些基因，其基因产物可与病毒相互作用，限制侵染。最明显的一个例子是，一些基因产物有控制病毒移出初侵染的细胞（阈下侵染）的能力或者产生限制其扩展的反应（过敏性坏死）。这在第 10 章第Ⅲ节已经论述过。

第三，阈下侵染和过敏性反应都是明显的反应，但是，在病毒与植物基因组之间也可能存在各种各样的不太明显与变化多端的相互作用。例如，环境因素对寄主基因组的影响能够影响病毒侵染的最终结果（第 12 章）。影响植物每一环节的代谢的因素又对植物侵染的空间和数量方面产生影响。例如，拟南芥中数个关键途径基因的转录受到生物钟（circadian clock）的调控（Harmer *et al.*，2000）。在病毒的系统侵染过程中，这种对寄主的影响很可能也影响对单个细胞的侵染，继而又影响到受病毒侵染的植物的表型。

第Ⅵ节　讨论

上面阐述了发生在侵染过程中的病毒基因组内部的相互作用以及病毒和植物基因组间的相互作用。不但在RNA病毒方面，而且在DNA病毒方面现在也有越来越多的研究结果。它们的相互作用和功能的协调包括以下几个方面：

（1）病毒基因组的保护。多年来，对病毒基因组功能的发挥主要是在核酸的基础上加以考虑的。现在认为，可能病毒核酸在细胞中的任何阶段都不会单独存在，因为在此状态下核酸很快会被降解掉。因此，它们与蛋白质以及膜结合在一起以便在各种不同的复制阶段受到保护。

（2）如上所述，对于复制循环的每一阶段，病毒为了有效地顺序表达，在合适的地点、合适的时间，必须有适当量、适当构型的材料。因此协调复制循环的每一阶段很有必要。

（3）利用植物的一些功能可使病毒在侵染性基因组中缩减必须携带的基因的数目。然而，在细胞中病毒必须在合适的时间、合适的位点将其占为己有。病毒的基因产物也必须与植物基因产物相互作用，并且相互具有亲和性。

（4）各种功能的严格协调控制着病毒复制的水平。病毒必须控制产生后代的数量，以使病毒被转移至其他寄主的机会最大化，同时减少对当前寄主的不可逆性破坏。

第 14 章　类病毒、卫星病毒和卫星 RNA

各种小分子 RNA 能参与一些侵染性植物病害的发生。大多数小分子 RNA 可被归为两类：一类能够独立复制，另一类复制时需要功能病毒。前者称为类病毒（viroid），后者包括病毒卫星（satellite）和缺损核酸。缺损核酸在第 8 章（第Ⅸ节 C）中已做过介绍。本章只阐述类病毒和病毒卫星。

第Ⅰ节　类病毒

已证实一些类似病毒病的重要病害是由称为类病毒的致病性 RNA 引起的。“类病毒”这个术语最早由 Diener 于 1971 年提出，用于描述马铃薯纺锤块茎病害的侵染性病原物。类病毒是小的环状分子，几百个核苷酸长，具有高度的二级结构。它们不编码任何多肽，可独立于任何伴随的植物病毒而复制。类病毒可引起多种经济上重要的病害，因而具有实际重要性，同时由于它们是最小的侵染性病原物从而在生物学上也引起人们广泛的研究兴趣。关于类病毒的研究已有一些综述，如 Diener（1987b）、Diener（1993）、Flores 等（1997）、Symons（1997）和 Diener（1999）。研究最多的类病毒是马铃薯纺锤块茎类病毒。类病毒的英文名称缩写时加上“d”以区别于病毒名称的缩写。现将类病毒的缩写列于附录 1 和表 14.1 中。

A. 类病毒的分类

依据 RNA 分子的序列和推测的结构，类病毒分为两个科：马铃薯纺锤块茎类病毒科（*Pospiviroidae*）和鳄梨日斑类病毒科（*Avsunviroidae*）（Flores *et al*., 2000）；每个科包括数个属（表 14.1）。

表 14.1　类病毒的分类

科	属	种	缩写[a]	基因组大小 nt	参考文献[b]
马铃薯纺锤块茎类病毒科（*Pospiviroidae*）	马铃薯纺锤块茎类病毒属（*Pospiviroid*）	马铃薯纺锤块茎类病毒	PSTVd	356～360	1
		菊矮化类病毒	CSVd	354～356	1
		柑橘裂皮类病毒	CEVd	370～375	1
		金鱼花潜隐类病毒	CLVd	370～373	1
		血苋类病毒 1 号	IrVd 1	370	1
		墨西哥心叶茄类病毒	MPVd	361	2
		番茄顶缩类病毒	TASVd	360～363	1
		番茄雄性株类病毒	TPMVd	360	1

续表

科	属	种	缩写[a]	基因组大小/nt	参考文献[b]
	啤酒花矮化类病毒属（*Hostuviroid*）	啤酒花矮化类病毒	HSVd	297～303	1
	椰子死亡类病毒属（*Cocadviroid*）	椰子死亡类病毒	CCCVd	246～247	1
		柑橘类病毒Ⅳ号	CVd-Ⅳ	284	1
		椰子败生类病毒	CtiVd	254	1
		啤酒花潜隐类病毒	HLVd	256	1
	苹果锈果类病毒属（*Apscaviroid*）	苹果锈果类病毒	ASSVd	329～330	1
		苹果凹果类病毒	ADFVd	306	1
		澳洲葡萄类病毒	AGVd	369	1
		柑橘类病毒Ⅲ号	CVd-Ⅲ	294～297	1
		柑橘曲叶类病毒	CBLVd	318	1
		葡萄黄点类病毒 1 号	GYSVd-1	366～368	1
		葡萄黄点类病毒 2 号	GYSVd-2	363	1
		梨疱状溃疡类病毒	PBCVd	315～316	1
	锦紫苏类病毒属（*Coleviroid*）	锦紫苏类病毒 1 号	CbVd-1	248～251	1
		锦紫苏类病毒 2 号	CbVd-2	301	1
		锦紫苏类病毒 3 号	CbVd-3	361～364	1
鳄梨日斑类病毒科（*Avsunviroidae*）	鳄梨日斑类病毒属（*Avsunviroid*）	鳄梨日斑类病毒	ASBVd	246～250	1
	桃潜隐花叶类病毒属（*Pelamoviroid*）	桃潜隐花叶类病毒	PLMVd	336～339	1
		菊花褪绿斑驳类病毒	CChMVd	399	3

注：a. 见附录 1；

b. 1，Flores 等（1997）；2，Martinez-Soriano 等（1996）；3，Navarro 和 Flores（1997）；所有文献引用均得到版权许可。

香石竹小类病毒样（carnation small viroid-like，CarSV）RNA 不符合上述分类，它与类病毒相似，含有的正链和负链都通过锤头结构进行自体切割（Hernández *et al.*，1992）（见下文）。然而，纯化的 RNA 不侵染香石竹，但 CarSV 的序列已从“受侵染的”香石竹中分离出来（Daròs and Flores，1995）；而且已发现 CarSV DNA 直接与花椰菜花叶病毒属的 CERV（香石竹蚀环病毒）的 DNA 序列相连接（Daròs and Flores，1995）。CarSV DNA 的一系列的头尾相连的多聚体形式与 CERV 基因组的特定区域相连接（Vera *et al.*，2000）。每个连接处有短核苷酸链与 CarSV 和 CERV DNA 的序列均相同，说明这种结构来源于一种聚合酶驱动的机制（polymerase-driven mechanism）。除了大量的 CarSV RNA 外，还存在一系列的缺失突变体，其中一些还有相对应的 DNA 形式。

B. 类病毒的病理学

1. 宏观病害症状

类病毒可侵染双子叶植物和单子叶植物。类病毒造成的症状与第 3 章讲的病毒症状无法区分。这些症状包括黄化、斑驳、叶片扭曲和坏死。从农作物角度来看有一系列症

状，包括从由 CCCVd 引起椰子树的慢性坏死（Haseloff *et al.*，1982）到 HLVd 引起的世界性分布的无症状侵染（Puchta *et al.*，1988）。很可能还有许多类病毒引起的无症侵染有待于发现。

2. 细胞病理变化

据报道，类病毒可引起不同细胞结构的变化。例如，一些侵染引起称为"质膜体"(plasmalemmasome）的膜结构的变化。数位研究者报道了类病毒侵染的组织中细胞壁明显起皱（corrugation）和不规则增厚（Momma and Takahashi，1983)。此外，类病毒侵染的细胞中叶绿体发生退化性畸形（da Graca and Martin，1981)。

3. 类病毒的亚细胞定位

采用激光共焦显微术和透射电镜技术，结合原位杂交，在维管束组织和叶肉细胞中均发现了 CEVd 和 CCCVd（Bonfiglioli *et al.*，1996)。

依据类病毒侵染的细胞的分部组分（fractionating component）实验，现在普遍认为大多数类病毒存在于细胞核内（Riesner，1987)。但 ASBVd 是主要的例外，它存在于叶绿体中（Bonfiglioli *et al.*，1994；Lima *et al.*，1994)。在细胞核内，PSTVd 和 CCCVd 存在于核仁，而 CEVd 在核质内累积到很高的浓度（Harders *et al.*，1989；Bonfiglioli *et al.*，1996)。

4. 生化变化

类病毒侵染在寄主核酸代谢中不引起总量的变化，相反，在侵染组织内存在着不同的寄主蛋白质的显著变化，如 14 kDa 蛋白质（Diener，1987a)。可能最明显的变化是几种不同类病毒侵染导致的番茄中 140 kDa 寄主蛋白质的增加（Camacho-Henriquez and Sänger，1984)。这种蛋白质的诱导并不是特异于类病毒侵染的，也曾观察到其他 PR 蛋白的增加，在类病毒侵染后，其中一些蛋白质在体内可结合类病毒分子（Grannel *et al.*，1987；Hadidi，1988)。Hiddinga 等（1988）鉴定了一个寄主编码的 68 kDa 蛋白质。该蛋白质在类病毒侵染的组织和模拟接种的组织抽提物中受到差别磷酸化。该蛋白质是依赖于 dsRNA 的蛋白激酶，与哺乳动物组织中调节病毒合成的一种蛋白质具有血清学相关性。也曾发现类病毒的侵染显著改变了细胞壁的组分（Wang *et al.*，1986)。

5. 在植物体内的移动

含有缺损外壳蛋白的病毒和裸露 RNA 可通过细胞间移动方式在植物体内缓慢移动。相反，类病毒在寄主植物中移动迅速。当将 PSTVd cDNA 克隆产生的侵染性转录物用核苷酸特异的荧光染料 TOTO-1 碘化物标记，并注射到与共质体分离的(symplastically isolated）保卫细胞中时，类病毒会一直留在受注射的细胞中（Ding *et al.*，1997)。然而，当将标记的 RNA 注射到与共质体相连的叶肉细胞中时，则其可在细胞间迅速移动。具有 1400 nt 的 RNA 转录物不能从受注射的细胞中移动出来，但当转录物含有 PSTVd 时，则可进行细胞间移动。从这些研究中可得出结论：类病毒通

过胞间连丝在细胞间移动，并且这种移动是由特定序列或结构模体（structural motif）介导的。

几乎可以肯定，类病毒的长距离移动是通过韧皮部进行的（Palukaitis，1987；Zhu *et al*.，2001）。类病毒 RNA 对核酶攻击的相对抗性可能会促进其长距离移动，类病毒“粒子”也有可能通过结合一些寄主蛋白质而进行转运。

6. 传播

类病毒在大多数寄主中易于通过机械方式传播。在田间可能主要通过污染的工具或类似方式传播。在有核酸酶（nuclease）存在的情况下还这么容易传播，可能是由于类病毒的二级结构以及在传播过程中类病毒与寄主组分形成复合体。

PSTVd 通过马铃薯植株的花粉和真种子传播（Grasmick and Slack，1986），并可在侵染的种子中长期存活。然而，该传播途径在经济方面对马铃薯并不重要。已证实数种类病毒在番茄（Kryczynski *et al*.，1988）和葡萄（Wah and Symons，1999）中可通过花粉和种子传播。

据报道 PSTVd 可由马铃薯长管蚜（*Macrosiphum euphorbiae*）通过非持久性方式低频率传播（De Bokx and Piero，1981），当在毒源植物中与 PLRV 共侵染时，蚜虫可将类病毒传播到最高达 100%的供试植物上（Salazar *et al*.，1995；Syller *et al*.，1997）。然而在对该传播途径进行仔细分析时，Singh 和 Kurz（1997）发现 PSTVd 与 PLRV 共侵染时，只有 7%的低传播率，如第 11 章（第Ⅲ节 H. 1. a）所述，蚜虫传播类病毒的问题仍值得讨论。因此，这类病原在田间经蚜虫传播的重要性值得怀疑。

7. 流行学

类病毒在作物间传播的主要方式是通过无性繁殖材料、机械污染、花粉和种子。这些方式的相对重要性因不同的类病毒和寄主而异。例如，马铃薯中的 PSTVd 与菊花中的 CSVd 以无性繁殖材料传播为主。机械传播为其他类病毒的主要传播途径，如柑橘的 CEVd 和啤酒花中的 HSVd。鳄梨中 ASBVd 的传播是通过花粉和种子。

对于多数类病毒病害而言，接种体的来源看来是在作物自身体内，因此提出了类病毒病害从何而来这样的问题。有证据表明许多类病毒病是最近才发生的（Diener，1987a）。正如 Diener 指出的，在 1900 年以前，人们并不知道目前已知的类病毒病的存在，事实上，其中许多是在 1940 年后才描述的，新类病毒病的突然出现和迅速传播可由下列因素解释：类病毒易于通过机械方式传播；许多现代作物以大规模单作方式（monoculture）种植；因此，时常存在于自然寄主中的类病毒也许平时不引起病害，但若逃逸到相邻感病的经济作物上可能会在其中迅速扩散。如果类病毒和作物没有一起协同进化，很可能会发生病害。有直接的证据表明这些事件的结果，如墨西哥的番茄雄性株病（tomato planta macho disease）的发生就是一例（Diener，1987a）。在英国，对 HLVd 的研究表明，当前啤酒花上该类病毒的流行是由于在 1970 年代后期啤酒花繁殖材料发生侵染的后果（Barbara *et al*.，1990）。

C. 类病毒的结构

1. 类病毒 RNA 具有环状结构

最初通过电镜首先观察到了许多类病毒的环状结构。在非变性条件下呈短棒状，轴比（axial ratio）约为 20：1，就 PSTVd 而言，平均长度约为 37 nm。在变性条件下伸展开时，呈共价闭合环，其外形长度（contour length）为 100 nm（Sänger *et al.*，1976；McClements and Kaesberg，1977；Riesner *et al.*，1979）。所有的类病毒制剂均含有不同比例的线状分子。

2. 核苷酸序列

已测定 27 种类病毒及其许多变株（variant）的核苷酸序列。长度范围为 246～475nt（表 14.1）。这些序列证实了分子的环状结构性质（图 14.1）。所有类病毒的序列均存在一定程度的相似性。依据核苷酸全序列的相似程度，已确定 27 种不同的类病毒，被归在不同的属中（表 14.1）。今后将会继续发现其他不同的类病毒。

图 14.1 PSTVd 的结构。下方：由 Gross 等（1978）发表的核苷酸序列；中间：推测的二级结构轮廓；上方：类病毒分子的三维结构。引自 H. Sänger，见 Matthews（1991）。

多数类病毒的 G+C 含量较高（53%～60%），但 ASBVd 则富含 A+U（62%）。类病毒及类病毒样 RNA 的序列数据库每年更新、发表，我们可从下述网址检索（Pelchat *et al.*，2000）：

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Viroids

通过 cDNA 克隆已测定了一些类病毒的田间分离株的序列，结果表明单一分离株（isolate）可含有一系列非常接近的序列变株（sequence variant）（Visvader and Symons，1985）。

3. 二级结构

根据一级结构可以推测含有最多碱基对的二级结构。依据二级结构的特点，类病毒

归为前述的两个科。据推测马铃薯纺锤块茎类病毒科（*Pospiviroidae*）成员的RNA可形成棒状结构，碱基配对区与未配对的环相间；而鳄梨日斑类病毒科（*Avsunviroidae*）成员的RNA结构则相对简单（图14.2）。

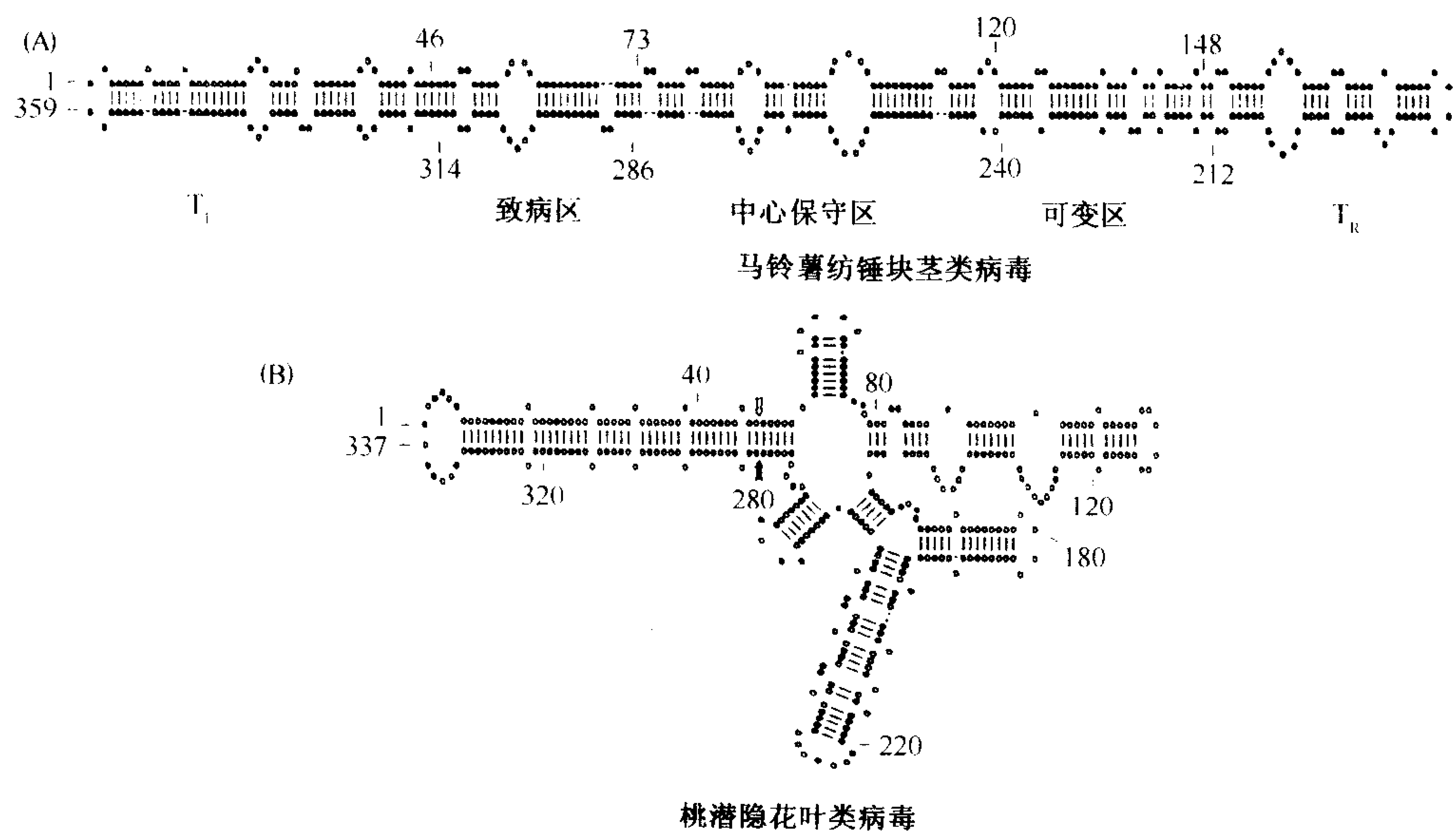


图14.2 PSTVd和PLMVd的二级结构。（A）由物理、化学研究数据和酶切图谱所确定的PSTVd的棒状二级结构。左末端区（T_L）、致病区、中心保守区、可变区和右末端区（T_R）的边界以垂直线标明。（B）推测的PLMVd最低自由能的结构。推测的正链和负链的自身切割位点分别用实箭头和空心箭头标明。选自Owens（1999），根据Hernández和Flores（1991）重新绘制，承蒙版权拥有者（© The National Academy of Sciences, USA）惠允。

双链核酸的解链曲线已在第5章（第V节C.1中）讨论过。通过对PSTVd的解链曲线的详细研究，结合序列数据，Riesner等（1979）建立了随温度升高PSTVd RNA变性阶段的模型。Steger等（1984）提出了更为精确的模型（图14.3）。

应当注意，这些结构是根据计算机或体外（*in vitro*）实验推测出来的，在活体内，类病毒可能与寄主蛋白质结合而形成其他的结构。然而还有一些证据表明在活体（*in vivo*）内部至少为部分棒状结构，因为能生存的重复（viable duplication）或缺失仍然保留着这种类型的结构（Haseloff *et al.*, 1982；Semancik *et al.*, 1994；Wassenegger *et al.*, 1994）。

据认为类病毒含有的某种三级结构对其与寄主蛋白质的相互作用非常重要（Branch *et al.*, 1985；Cast *et al.*, 1996）。

a. 马铃薯纺锤块茎类病毒科的结构

在马铃薯纺锤块茎类病毒科的所有成员中，其推断的棒状结构均含有5个结构-功能域（图14.2）（Keese and Symons, 1985）：C（中心区）、P（致病区）、V（可变区）、T_R（右末端区）和T_L（左末端区）。最初认为这些区域具有特定的功能，但现在看来情况更为复杂。例如，症状表现是由位于T_L、P、V和T_R区的一系列决定子（determinant）所控制的（Sano *et al.*, 1992）。

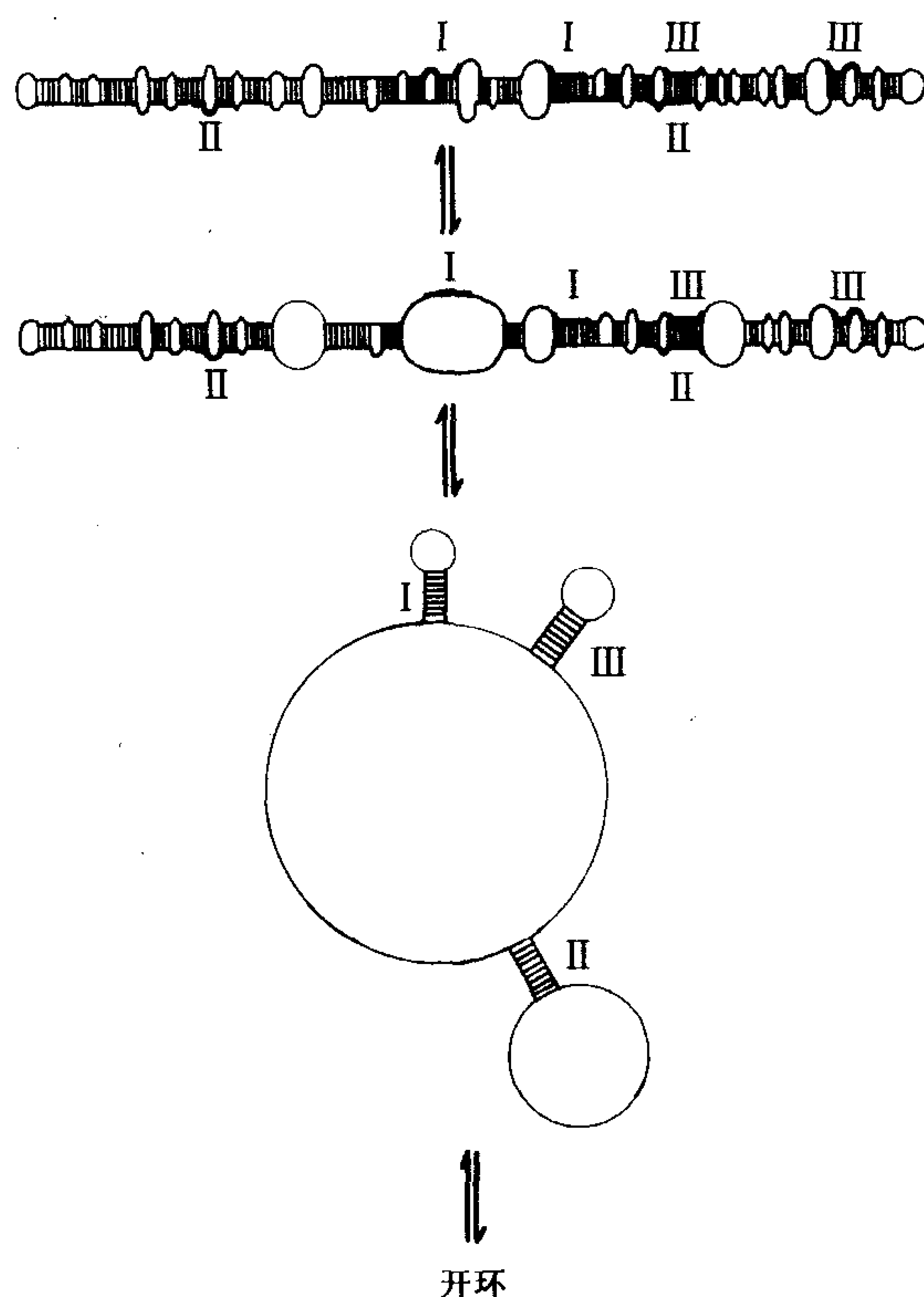


图 14.3 PSTVd 的变性和复性机制。分别代表温度在 25℃、70℃、75℃和高于 95℃时的结构示意图。在主要转变阶段 PSTVd 可能会形成 2 个或 3 个发夹结构（I、II与III）。图中的发夹结构是由下列区域的碱基配对形成的：(I) 79～87/110～102、(II) 227～236/328～319 和 (III) 127～135/168～160。与 PSTVd 发夹结构I和II类似的结构也存在于 CEVd 和 CSVd 中。在 CCCVd 中，只有发夹结构I。承蒙惠允，引自 Steger 等（1984）。

C 区含有 95 nt 的中心保守区（central conserved region，CCR），CCR 含两套保守的核苷酸分别位于上链与下链，上链两侧具有反向重复序列（图 14.4）。依据中心区核苷酸的差异，CCR 分为 3 个类型，分别以 PSTVd、ASSVd、CbVd-1 为代表，每个类型可以进一步分成一些亚型。

推测 5 个亚组的非自切割的类病毒 CCR 的上链形成相似的发夹结构 1（hairpin 1），在相似位置有保守的核苷酸（图 14.5）。

马铃薯纺锤块茎类病毒科（*Pospiviroidae*）成员中还有另外两段保守的序列。末端保守序列（TCR）在 *Pospiviroid* 和 *Avsunviroid* 两个属中以及 *Coleoviroid* 属中的两个最大的成员（CbVd-2 和 CbVd-3）是保守的（图 14.4）。该 TCR 序列（CNNGNG-GUUCCUGUGG）的保守性，以及存在于这 3 个类病毒属相似的位置，表明它具有重要功能。在含有 300 nt 或更小的类病毒中未发现 TCR。在大多数这些较小的类病毒中具有另一保守序列（CCCCUCUGGGGAA），该保守序列形成左末端保守发夹结构（terminal conserved hairpin，TCH）（图 14.4）。

P 区有以腺嘌呤为主、富含嘌呤的一条链，oligo（U）序列在另外一链，据推测在致病过程中起作用（第 I 节 E）。

图 14.4 不同亚组的非自切割的类病毒类似棒状结构的模型。每个属的模式成员标在右边，图的最顶端标出了5个结构域：C（中心区）、P（致病区）、V（可变区）、T_L（左末端区）和 T_R（右末端区）。图中显示了中心保守区（CCR）、末端保守区（TCR）和末端保守发夹结构（TCR）的核心核苷酸序列。箭头显示与 CCR 上链核心核苷酸形成非完全反向重复序列的侧翼序列。HSVd CCR 的核心核苷酸序列通过与 PSTVd 属的 CLVd 比较（TCR 的存在、TCH 的缺少，全序列的相似性）而得以界定。PSTVd 属 的 IrVd 的 CCR 和 TCR 的替换碱基由小写的字母表示。就锦紫苏类病毒属（CbVd）而言，TCR 只存在于两个最大的成员 CbVd2 和 CbVd3 中。承蒙惠允，引自 Flores 等（1997）。

图 14.5 五个亚组非自切割类病毒的 CCR 上链形成的发夹结构 1。双线字体表示在所有结构中在相似位置保守的碱基。承蒙惠允，引自 Flores 等（1997）。

V 区是分子中最多变的区，在其他区域相似的类病毒中同源性低于 50%。PSTVd 样的类病毒之间主要的序列同源区位于两个末端区域，如图 14.2 和图 14.4 所示。它们在类病毒复制中起作用（第Ⅰ节 D）。

b. 鳄梨日斑类病毒科的结构

该科的成员与其他类病毒显著不同，它们缺少 CCR，并且两极（基因组链及其互补链）均含有锤头状核酶（第Ⅰ节 D. 4. b）。CChMVd 和 PLMVd 的 RNA 含有更复杂的具分支的二级结构（Bussière *et al.*，2000）。

D. 类病毒的复制

关于类病毒复制的研究，Sänger（1987）、Robertson 和 Branch（1987）、Flores 等（1997）做了详细的综述。

即使假定 3 个潜在的异相位（out-of-phase）可读框均可被充分利用，类病毒也没有足够的信息来编码 RNA 复制酶。然而，在理论上，它们有可能编码相当小的多肽以便与寄主蛋白质结合形成类病毒特异的复制酶，如同小噬菌体 Qβ 在寄主中那样。尽管如此，现在大家普遍认为类病毒不能翻译产生任何多肽。主要的证据是：①一些类病毒含有一个或是更多的 AUG 密码子，但许多类病毒如 PSTVd 变异株不含有 AUG 密码子。但我们也不能忽视非 AUG 起始密码子（第 7 章第Ⅴ节 B. 6）。②在各种条件下利用不同体外系统未能证实类病毒 RNA 具有 mRNA 的功能。③分析健康和类病毒侵染的叶片组织中的蛋白质未能揭示出任何类病毒编码的新的多肽的存在。

1. 复制场所

前面提到，*Pospiviridae* 成员的 RNA 存在于细胞核中。有证据表明该科的类病毒在此处复制。然而，鳄梨日斑类病毒科（*Avsunviroidae*）的成员则存在于叶绿体中。Navarro 等（1999）发现了多种形式的 ASBVd RNA，表明叶绿体中存在着复制中间体。而且如下所述，有证据表明叶绿体的聚合酶参与了该类病毒的复制。同样地，在叶绿体中存在着 PLMVd 的正链和负链（Bussière *et al.*，1999）。

病毒进入细胞核和质体，通常受到与该病毒基因组相伴随的蛋白质上的信号控制（第 9 章第Ⅱ节 C）。用荧光素标记或 GFP 标记的转录物研究了 PSTVd 进入细胞核或透化处理的（permeabilized）烟草 BY2 细胞的过程（Woo *et al.*，1999；Zhao *et al.*，2001）。观察到 PSTVd 的核输入（nuclear import）情况，但对相同大小的 mRNA 片段或另两种类病毒 ASBVd 或 PLMVd 则不是这样，据认为后两种类病毒是在叶绿体内复制的。加入 10 倍过量的非荧光的 PSTVd，其核输入受到抑制，但加入相同数量的非输入的 RNA 时不受抑制。这些和其他观察表明：①PSTVd 含有决定核输入的序列或结构模体；②核输入与细胞骨架无关，而是由特异性且可饱和的受体介导的。

Avsunviroidae 的成员有可能存在着进入叶绿体的信号，但仍有待于证实。

2. 复制的模板

Grill 和 Semancik（1978）最早报道，与类病毒 RNA 互补的 RNA 链（就类病毒而言称为负链）存在于 CEVd 侵染的组织中。Owens 和 Cress（1980）观察到：PSTVd

的负链，存在于 RNA 酶处理过的 PSTVd 的 dsRNA 中，其电泳迁移率与 359 个核苷酸的线状正链相同。Zelcer 等（1982）发现 PSTVd 侵染的组织含有与类病毒 RNA 互补的 RNA。后来的研究表明 PSTVd 负链 RNA 以数个单位长度的单体串联组成的多体形式存在（Branch *et al.*，1981）。它们是以与具有广泛的双链区域形成的复合结构而存在的。进一步研究表明，单体 PSTVd 正链不论环状或线状，均与多体的负链形成复合结构。双链复合体的合成与正链 RNA 同时增加（Owens and Diener，1982）。对 PSTVd 侵染叶绿体的时程（time course）研究发现寡聚线状负链 RNA 的形成先于正链寡聚体，表明负链寡聚体是临时中间体（Faustmann *et al.*，1986）。

3. 类病毒 RNA 复制的机制

上面简要述及的以及许多其他的实验（Steger *et al.*，1986）表明类病毒经由 RNA 模板进行复制。闭环单体与长的线状多聚体复合物的存在说明经滚环复制模式产生子代类病毒 RNA 的高度可能性，因此现在已普遍接受了这种复制机制。数个滚环复制机制的模型已经提出（Branch *et al.*，1981；Owens and Diener，1982；Branch and Robertson，1984；Ishikawa *et al.*，1984；Hutchins *et al.*，1985）。图 14.6（左边）展现了两个滚环模型。就非对称途径而言，起始侵染的环状正链单体被转录成线状负链多聚体，以

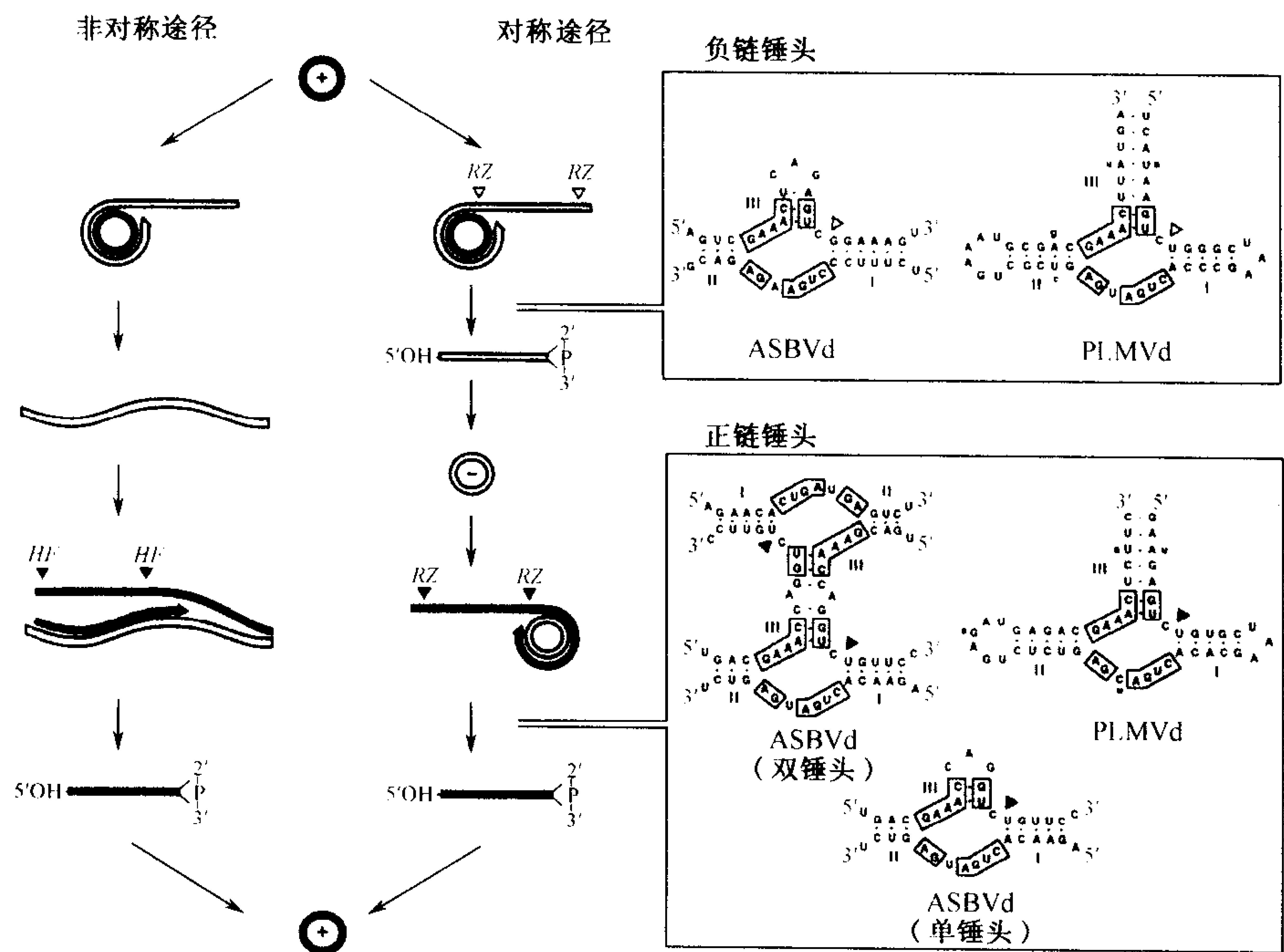


图 14.6　类病毒复制模型。正链（实线）传统上指大量的侵染性 RNA，负链（空心线）指其互补链。可选择的非对称和对称途径分别包括 1 个或 2 个滚环复制。在对称途径中，多聚链的正链和负链由锤头状的核酶（RZ）切割，形成线状的单体 RNA，包含 5′-羟基，以及 2′，3′-环磷酸末端。箭头标明切割位点。由 ASBVd 和 PLMVd RNA 形成的锤头结构在右边显示，方框图显示保守核苷酸，在 PLMVd cDNA 中的碱基替换由较低位置的字母表示。在非对称途径中，由寄主因子（HF）切割多聚链，形成线状单体 RNA，可能含有 5′-羟基，以及 2′，3′-环磷酸末端。承蒙惠允，引自 Flores 等（1997）。

此再由模板合成线状多体正链。而在对称途径中，线状多聚体负链经过切割加工、连接而形成负链单体环，进而作为线状多体正链合成的模板。在两种情况下，多体正链均加工产生单体环状分子。由于对称途径包含正链和负链环状形式，非对称途径只含有负链环状形式，这两种机制的区别在于有无负链环状形式的存在。这种 RNA 分子在 PSTVd 侵染的植物中尚未发现（Branch *et al.*，1988a），因此，PSTVd 的复制被认为采用非对称途径。相反，在 ASBVd 侵染的植物中已发现负链环状单体 RNA 分子（Hutchins *et al.*，1985；Daròs *et al.*，1994），表明其复制采取对称途径。

4. 参与类病毒复制的酶

既然类病毒不编码它们自己的多肽，我们推测类病毒采用已存在的、寄主的核酸合成酶。健康植株含有两类合成 RNA 的酶：依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶Ⅰ、Ⅱ与Ⅲ和依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶。对类病毒复制的早期实验，尤其是放线菌素 D 抑制类病毒在叶片组织中复制的发现，曾使人认为类病毒通过 DNA 模板复制。然而，在侵染组织中没有发现类病毒特异性的 DNA（Zaitlin *et al.*，1980；Branch and Dickson，1980；Hadidi *et al.*，1981）。现在普遍认为类病毒通过负链 RNA 模板复制（见上文）。

类病毒采用滚环机制复制需要 3 种酶：RNA 聚合酶、用于滚环复制时加工多聚产物的 RNA 酶和用于形成环状单体的 RNA 连接酶。

a. RNA 聚合酶

参与类病毒 RNA 复制的寄主 RNA 聚合酶，尚未得到充分鉴定，并且还存在着很多争论。

Mühalbach 和 Sänger（1979）研究了 α-鹅膏蕈碱对黄瓜白果类病毒（现在称为 HSVd）在番茄原生质体中复制的效果。他们发现 10^{-8} mol/L 的 α-鹅膏蕈碱抑制类病毒合成，这是依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶Ⅱ的特征。Rackwitz 等（1981）从健康的植株组织中纯化了该酶，发现在体外它能以类病毒的正链为模板合成全长线形负链。因为其他酶也能够在体外合成类病毒 RNA，该项研究并不能证明聚合酶Ⅱ的作用（Symons *et al.*，1985）。聚合酶Ⅱ在特定位点起始合成不同类病毒的负链（Sänger，1987）。不同研究者曾证实类病毒在核内复制与积累，这正是 RNA 聚合酶Ⅱ发挥作用的场所（Takahashi and Diener，1975）。另外，Rivera-Bustamente 和 Semancik（1989）从 CEVd 侵染的组织中制备的亚核组分可合成 CEVd RNA。

其他研究表明依赖 DNA 的 RNA 聚合酶Ⅰ可能起某种作用，该酶通常在核仁内里执行核糖体 RNA 合成的功能。Riesner 等（1983）证明 PSTVd RNA 在核仁内积累，但 Palukaitis 和 Zaitlin（1987）报道 PSTVd 存在着与 rDNA 启动子序列相似的区域。依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶Ⅲ在体外可将类病毒 RNA 转录成完整的（全长）拷贝，然而聚合酶Ⅰ只合成少量较小的产物（Sänger，1987）。

此外，还有第三种可能性。健康番茄植株中依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶能够利用 PSTVd RNA 作为模板产生少量的全长拷贝（Boege *et al.*，1982），较高浓度的 α-鹅膏蕈碱也不能抑制其合成。该类病毒拷贝是第一个研究清楚的可由来自于健康植株中依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶在体外合成的均一产物（Sänger，1987）。

采用分离的细胞核研究法表明马铃薯纺锤块茎类病毒科成员的负链到正链的转录可

能由依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶Ⅱ执行，现在普遍认为就是这种酶参与了该阶段的复制过程（Schindler and Mühlbach，1992）。然而，并不能肯定这种酶也参与正链到负链的复制过程。

ASBVd，尤其是其正链的复制，对 α-鹅膏蕈碱不敏感（Marcos and Flores，1992）。这表明 ASBVd 或者利用核内对 α-鹅膏蕈碱不敏感的聚合酶或者在叶绿体中复制，叶绿体中的 RNA 聚合酶对 α-鹅膏蕈碱是不敏感的。迄今已报道了两种叶绿体 RNA 聚合酶，其中一个由质体（plastid）编码，另一个由核编码。ASBVd 的复制不受抑制剂万寿菊菌毒素（tagetitoxin）的影响，而该抑制剂能阻断数个叶绿体基因的转录（Navarro *et al.*，2000）。根据 ASBVd 在胞质中复制的事实，它可能被核编码的聚合酶所催化。然而，也不排除存在着未知的、由叶绿体编码的抗万寿菊菌毒素的聚合酶。

b. RNA 切割

Hutchins 等（1986）制备了 ASBVd 的串联的二聚体 cDNA 克隆，并从这些克隆转录了 RNA 二聚体。他们发现正链、负链 RNA 转录物在特定位点自体切割，分别形成正链、负链类病毒单体。他们提出在切割点附近形成锤头状二级结构（图 14.16），与卫星 RNA 的相同（图 14.15）。然而，ASBVd 锤头状结构未必是足够稳定的，所以 Forster 等（1988）提出一个双锤头状结构模型，包括形成两条正链或两条负链锤头状结构（图 14.7）。这个模型有两个优点：①推测的切割位点足够稳定；②单体长度 RNA 不能进一步切割，只有双体或多体能够形成双锤头状结构而进行自切割。正如第

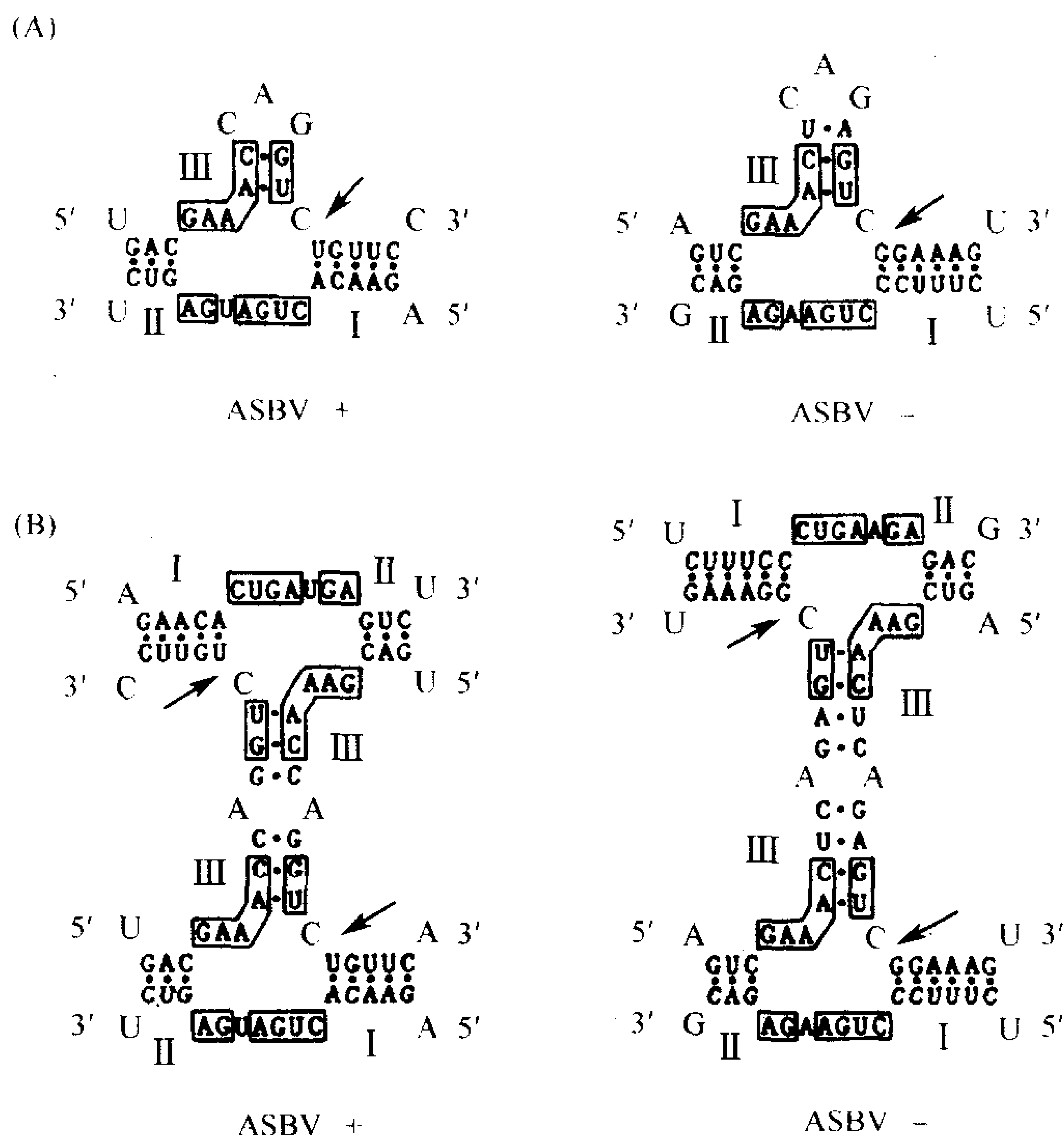


图 14.7 自切割 ASBVd RNA 的锤头状结构模型。（A）Hutchins 等（1986）提出的单一锤头状结构，与自切割的卫星 RNA 相似（图 14.15）。（B）Forster 等（1988）提出的 ASBVd RNA 双锤头状结构模型。切割位点由箭头标明。ASBVd、蝾螈的自切割 RNA、植物卫星 RNA 的保守核苷酸由框图表示。承蒙版权拥有者（© Macmillan Magazines Ltd）惠允，引自 Flores 等（1988）。

Ⅱ节 B.5 部分所述，结构自体切割需要二价离子来产生 5′-羟基和 2′，3′-环磷酸 3′端。在 ASBVd 中形成正链和负链自体切割结构所需的序列位于分子中间，类病毒全序列中大约 1/3 的序列可发挥自体切割的功能（Symons *et al.*，1987）。

并不是所有可自体切割的类病毒和卫星 RNA 都由锤头状结构切割，这些体外的自体切割的 RNA 分子分为 3 类（表 14.2）：①正链、负链均由锤头状结构切割；②正链由锤头状结构切割；③正链由锤头状结构切割而负链由发卡状结构切割。这两种自体切割的结构见图 14.8。

表 14.2 在体外切割的植物 RNA 病原

	基因组大小/nt	RNA 自体切割的结构	
		（+）RNA	（−）RNA
类病毒			
ASBVd	246～251	锤头状	锤头状
PLMVd	337～338	锤头状	锤头状
类病毒样 RNA			
CarSV RNA	275	锤头状	锤头状
卫星 RNA			
sLSTV	322～324	锤头状	锤头状
sSNMV	377	锤头状	—
sSCMoV	322 和 328	锤头状	—
sVTMoV	365～366	锤头状	—
SARMV	300	锤头状	发夹状
sCYMV	457	锤头状	发夹状
sTRSV	359～360	锤头状	发夹状
sBYDV	322	锤头状	锤头状

承蒙惠允，引自 Symons（1997）。

在其他类病毒如 PSTVd 和 CEVd 中未发现上面提到的 ASBVd 和卫星 RNA 的那两类二级结构。而且 Tsagris 等（1987a）在一系列离体的条件下，验证了寡聚体线状 PSTVd RNA 分子，但未有证据表明具有与 ASBVd 一样的自体催化的过程；另一方面，当与健康马铃薯细胞的核抽提物一起温育时，这样的寡聚体可精确地加工成单体（Tsagris *et al.*，1987b）。抽提物的不同处理证明切割线状单体需要抽提物中存在有催化活性的蛋白质。对于 PSTVd 来讲，从多聚体产生单体的过程中需要中心保守区起作用，其他较低效的位点也有一定作用（Hammond *et al.*，1989）。此外，可能还有其他的切割机制，如 Flores 等（1997）与 Liu 和 Symons（1998）所述。

c. RNA 连接酶

类病毒复制的最后一步是线状单体分子连接形成环状分子。线性 PSTVd 单体分子通过从小麦胚分离出来的 RNA 连接酶的作用，可有效地转变成环状分子（Branch *et al.*，1982）。Tsagris 等（1987b）证明马铃薯核抽提物可将 PSTVd 多体 RNA 切割成线状单体分子，也可将这些单体分子连接成正链环状分子。连接过程可能由 5′-羟基以及

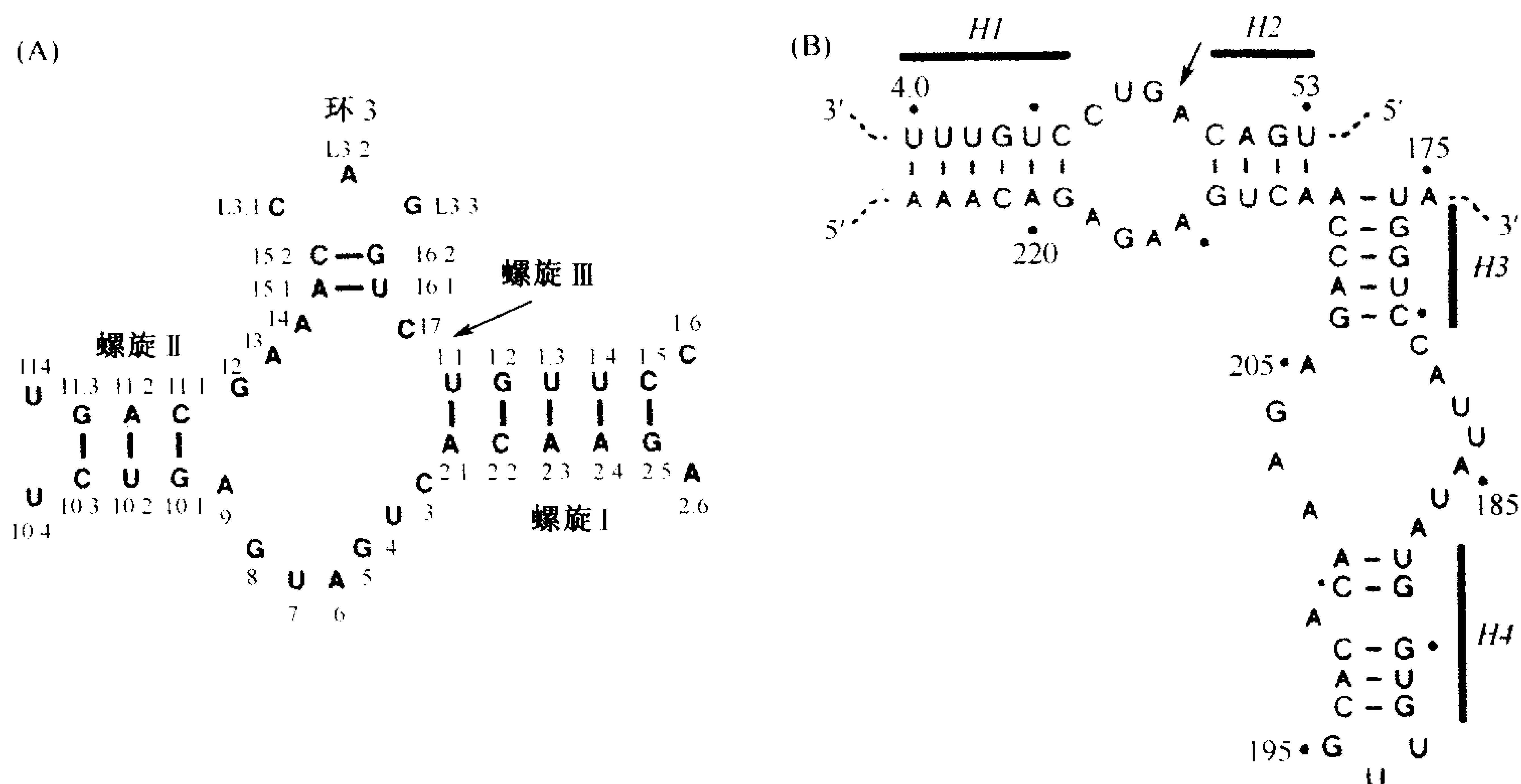


图 14.8 自切割的锤头状和发夹状结构。(A) ASBVd 正链的自切割锤头状结构。采用残基数字定位方法便于比较来自不同实验室的研究结果。(B) sTRSV 负链的自切割发夹结构。残基的数字是正链 RNA 的，因此走向是 3′→5′。H1～H4 是 4 个螺旋区。两个结构中均用箭头注明了自切割位点。承蒙版权拥有者（© Oxford University Press）惠允，引自 Symons (1997)。

在多体分子切割时形成的 2′，3′-环磷酸末端所支持。Kikuchi 等（1982）描述了从小麦胚中分离的新型 RNA 连接酶，可以使线状类病毒环化，形成 2′-磷酸单酯和3′,5′-磷酸二酯键。以前曾认为自切割的核酶可以自体连接（Lafontaine *et al.*, 1995），但如 Flores 等（1997）讨论的，可能寄主的某种酶也参与了该过程。

5. 复制的起始

越来越多的证据表明类病毒在环状模板的特定位置开始复制。采用引物延伸和末端加帽研究 ASBVd 的线状正链和负链表明，在位于预测的二级结构中富含 A+U 末端环的序列 UAAAA 处开始复制（Navarro and Flores, 2000）。该类病毒起始点附近的序列与核编码的叶绿体 RNA 聚合酶的启动子相似。采用马铃薯细胞核抽提物的体外转录，推测 PSTVd 链的起始发生在两个位点，而且均不在末端环上（Riesner *et al.*, 1999）。

6. 类病毒分子重组的证据

从已有的核苷酸序列资料分析，过去的不同类病毒间的重组事件可能发生于混合侵染时的复制期间（Keese and Symons, 1985）。例如，TASVd 看来是重组的类病毒，其大部分序列来自 CEVd 样的类病毒，但其 T2 结构域被类 PSTVd 的类病毒的 T2 结构域所取代（Keese and Symons, 1985; Hammond *et al.*, 1990）。AGVd 看来起源于大量的 RNA 重组，发生于其他 4 种类病毒之间。它的序列可划分为不同区域，每个区分别与 CEVd、PSTVd、ASSVd 或 GYSVd 序列相似性非常高，中央保守区是 ASSVd 的（Rezaian, 1990）。

7. 类病毒之间的干扰

Fernow (1967) 观察到，先接种非常弱的 PSTVd 株系，可保护 2 周以后再接种的新株系。然而，弱株系必须先侵染并定殖。在同时接种 PSTVd 的弱株系和强株系的试验中，即使弱株系 100 倍过量接种，强株系仍占优势，大多数植株发生严重的病害 (Branch *et al.*, 1988b)。交互保护不仅在同一类病毒的不同株系之间发生，而且也发生在不同类病毒之间 (Niblett *et al.*, 1978)。用由克隆的 PSTVd DNA 转录的 PSTVd RNA 与 HSVd RNA 一起接种时，PSTVd 降低了受侵染植株的 HSVd RNA 水平。用双价转录物 (PSTVd 强株系的两个拷贝与 HSVd 的两个拷贝相连接) 接种植物产生 PSTVd 症状，并且只有 PSTVd 的子代 RNA 可被检测到。目前还不清楚这种干扰作用的分子机制，但证明翻译后基因沉默防卫系统是否发挥作用将是有意义的 (参见第 10 章第Ⅳ节)。

就 CEVd 而言，保护作用效果有差异 (Duran-Vila and Semancik, 1990)。保护作用的强弱取决于弱株系和强株系接种的间隔时间长短。

E. 生物活性的分子基础

因为类病毒很小，而且能够自主复制，具有许多不同的结构，无特定多肽，这些特点为许多研究工作者提供了希望，即类病毒或许能成为一个简单的模式系统，用以阐明病原物的结构变异如何控制病害表达。但至今这个愿望尚未实现，如下述几段所述，非常小的核苷酸序列的变化可以引起类病毒所诱发症状的剧烈变化。所以，病害诱导肯定涉及一些寄主大分子与类病毒序列的特异性识别。在寄主大分子 (或分子) 的性质得到阐明之前，类病毒核苷酸序列和生物学特性之间的相互关系仍是推测性的。现在，虽然与类病毒结合的蛋白质已开始得到认识，但其可观察的实际生物学特性只有侵染性和病害的严重度。现将目前采用的 5 种研究方法简述如下：

1. 自然发生的类病毒变株的序列比较

序列比较法有其优点，因为在自然界存在许多类病毒序列的特定变异，这就提供了一系列有活力的突变体。唯一的困难在于许多自然侵染由类病毒变株体的混合物引起。但这样的问题可通过含有该类病毒已知单一序列的 cDNA 克隆加以解决。Visvader 和 Symons (1985) 的研究是该方法的一个范例。通过 cDNA 克隆，他们分离了 CEVd 的 11 个新变株。依据在番茄上症状的严重度将这些变株与已知的 6 个变株分为强毒株和弱毒株。决定致病性的序列差别和可变的结构域如图 14.2 所示。随后，他们利用嵌合体 cDNA 克隆把致病性决定子定位于 P_L 区域 (Visvader and Symons, 1986)。

对 PSTVd 而言，已证实只有 P 区参与致病性 (Schnölzer *et al.*, 1985)。根据它们在番茄上诱发的症状严重度可将 PSTVd 变株分为 4 类：温和型、中间型、严重型与致死型。病害严重度的提高与毒性控制结构域的二级结构在体外的稳定性降低相关。这样的相关性在上述的 CEVd 变株中未观察到 (Visvader and Symons, 1985)。

作为引起柑橘植株矮化的因子是类病毒的一个潜在的有意义的应用方面 (Semancik *et al.*, 1997)。推定的 CVd-III 的致病区的序列改变可造成 Etrog 柑橘的症状

明显减轻（Owens *et al.*，1999）。因此，采取合适的筛选方法，从体外合成的诱变的CVd III 群体中应能够找到具有不同矮化特性的类病毒。

2. 定点诱变

原则上，类病毒 cDNA 侵染性克隆可以使定点诱变技术用于研究结构变化对于病害形成的影响。实际上，类病毒序列的许多碱基变化可导致其失去侵染性，即使据推测这些变化可能对二级结构影响很小。当将含有单个碱基变化的 PSTVd cDNA，通过土壤杆菌（*Agrobacterium*）载体导入寄主植物，在接种植株中通过回复突变（reversion）可产生野生型类病毒（Owens *et al.*，1986；Hammond and Owens，1987）。该回复突变很可能是典型的具高频率差错的 RNA 复制造成的（第 8 章第Ⅸ节 A 部分；图 8.29）。由于存在着发生回复突变的可能性，一定要仔细检测从突变类病毒 cDNA 经接种产生的子代类病毒，以确定其 cDNA 接种体中是否还保留着这种变异。

3. 嵌合类病毒

构建嵌合类病毒 cDNA 是研究病害诱发的另一种途径，但至今仍很少取得成功。例如，Owens 等（1986）构建了混合串联的全长 PSTVd 和 TASVd cDNA 的二聚体，它们具有侵染性，但对子代类病毒的分析发现单个植株中只含有正常的 PSTVd 或 TASVd，未发现期望的嵌合体。Owens 等（1986）用另外一种方法构建了 PSTVd 和 TASVd cDNA 分子的部分构成的嵌合 cDNA 单体，但它们不具有侵染性。Hammond 等（1989）构建了 PSTVd 和 TASVd 的嵌合体，并产生了有很染性的子代。Owens 等（1990）构建了 TASVd 和 CEVd 的侵染性嵌合类病毒，在番茄上的症状比 TASVd 产生的轻微，与 CEVd 诱发的症状相似，因为该嵌合类病毒的致病区源自 CEVd。

4. 与寄主 RNA 的序列比较

鉴定类病毒的致病性序列的另一方法是寻找可能与类病毒结合的寄主 RNA 序列。如在核糖体 RNA 加工时，在 5.8S RNA 和 25S RNA 之间有一个内含子样的序列被切除。据认为 U3 小分子核 RNA（small nuclear RNA，snRNA）在反应中可结合内含子类的序列，并导致切除。Jakab 等（1986）发现 PSTVd 的两个区域和大豆 U3 snRNA 的序列具有相似性。基于这点，他们认为类病毒（除 ASBVd 外）的致病性是由于干扰正常的前体 rRNA 在核仁中的加工而致。Haas 等（1988）发现番茄叶组织中的该 7S RNA 与序列识别粒体 RNA 相似。它还有与 PSTVd RNA 参与调节致病性的部分明显互补的序列。因此，该 7S RNA 可能是类病毒 RNA 寄主的另一个靶标。

5. 类病毒结合蛋白质

当将类病毒与核抽提物在体外混合时，发现了一个与 PSTVd 结合的 43 kDa 的寄主蛋白质（Klaff *et al.*，1989）。在受侵染细胞的核中（体内）也发现类似的复合体。

采用筛选分析以检测和分离 RNA 结合蛋白时，Sägesser 等（1997）从番茄 cDNA 表达文库中检测到一种可结合 PSTVd 的蛋白质。

6. 小结

所有这些研究都还不能解释像类病毒这样小的病原物如何引起从无症到坏死的各种病害。以下几方面的显著进展将促进这个重要研究领域的进一步发展：①不同类病毒功能的特异性体内与体外分析；②体内类病毒结构的了解；③类病毒在植物中侵染、复制和移动时与其相互作用的寄主大分子的鉴定。

F. 类病毒的诊断方法

由于类病毒不产生任何特定的蛋白质，因此已成功应用于病毒检测的血清学方法不能用于类病毒导致的病害的诊断。同样地，因为检测不到典型的粒子，电子显微镜技术也不适用。由于这些原因，诊断方法主要限于生物学测定、凝胶电泳、PCR 和核酸分子杂交。

1. 生物学测定

在有合适的供试诊断寄主植物的情况下，生物学测定一直是类病毒检测和病害诊断的重要方法，并且目前对一些存在着不同严重度的类病毒株系进行检测仍然是重要的。通过应用可在同一作物中既引起轻微症状又引起严重病害的株系接种，已发现一些表现严重症状的指示植物（Singh，1984）。然而，对于一些类病毒病害，如椰子死亡病(cadang-cadang disease)，仍没有合适的指示寄主。一些类病毒的弱分离株不能产生可见的症状，而另一些分离株产生的症状受到环境的影响。由于这些原因，基于类病毒 RNA 特性的体外检测非常重要。

2. 凝胶电泳

通常在受侵染的寄主中类病毒含量非常低。因此，在合适的聚丙烯酰胺凝胶电泳系统中分析核酸之前，有必要进行初步纯化与浓缩。各种方法的改进显著地提高了电泳检测的灵敏度。例如，Schumacher 等（1986）设计了“回复”凝胶技术（“return” gel technique)，即样品先在非变性条件下电泳，然后应用可产生开环分子的变性条件，并使电极的极性反转。这样类病毒分子泳动变慢，与寄主的各种 RNA 明显区分开。该方法已成功地应用于马铃薯单个真种子（true seed）中 PSTVd 的检测（Singh *et al*.，1988b)。

3. 核酸分子杂交

基于核酸杂交的检测和诊断方法非常重要。为了应用于常规检测，有必要建立大量制备克隆化的、高度标记的 cDNA 的技术以及用于检测所需的澄清组织抽提物的方法(Owens and Diener，1981)。在第 15 章第Ⅴ节 C. 5 中将讨论如何制备标记的核酸探针。由于果树富含单宁，提取核酸可能较为困难。Astruc 等（1996）提出了采用无机溶剂的提取方法。在块茎和芽中 PSTVd 的常规检测已采用 RNA 探针。Sano 等（1998）采用合成的寡核苷酸探针来检测 HSVd 和 CEVd 的株系。点杂交方法现在已经广泛应用(如 CSVd 的检测，Candresse *et al*.. 1988)。这个方法结合非放射性 DNA 探针已用于植

物抽提物中类病毒的常规检测（McInnes *et al.*，1989；Roy *et al.*，1989）。组织印迹杂交（tissue print hybridization）也已用于包括 PSTVd 和柑橘类病毒等数种类病毒的检测（Romero-Durbán *et al.*，1995；Starklorenzen *et al.*，1997；Palacio-Bielsa *et al.*，1999）。

4. 反转录-聚合酶链反应（RT-PCR）

类病毒 RNA 可先被反转录成 DNA，然后用 DNA 进行聚合酶链反应（PCR），这称为 RT-PCR。RT-PCR 已用于数种类病毒的检测，如 ASBVd、ASSVd 和 CEVd（Hadidi and Yang，1990；Yang *et al.*，1992；Schnell *et al.*，1997）。

5. 小结

采用现有技术可以比较容易地证实类病毒侵染的阳性反应，但若要确保表现阴性反应的植物中没有类病毒则困难得多。而这对营养繁殖的作物来讲是非常重要的实际问题，类病毒病害的控治方法将在第 16 章（第Ⅱ节）中加以讨论。

第Ⅱ节　卫星病毒和卫星 RNA

从侵染的植物中提纯的病毒制备物（制剂）可能含有各种非基因组核酸。其中一些亚基因组 RNA 和缺损型 RNA 或 DNA，已在第 7 章和第 8 章中讨论过。另外，某些植物病毒的分离株含有卫星因子，即不编码用于复制的酶类的亚病毒侵染因子（subviral agent）。根据包被核酸的外壳蛋白质的来源，卫星因子分为两大类：卫星病毒和卫星核酸。对卫星病毒（satellite virus）而言，其基因组核酸编码其自身的外壳蛋白。对卫星 RNA 或卫星 DNA 而言，其核酸由其辅助病毒（helper virus）的外壳蛋白包裹。卫星病毒和卫星核酸具有下列共同特性：

• 其遗传物质是小分子核酸。该核酸不是辅助病毒基因组的一部分，通常除末端区域外，几乎没有序列相似性。
• 核酸复制依赖于特定的辅助病毒。
• 至少在一些寄主中能够影响症状表达。
• 卫星核酸的复制在一定程度上干扰辅助病毒的复制。
• 卫星依其自身的核酸模板进行复制。

RNA 和 DNA 病毒均可以有卫星相伴随，RNA 病毒的卫星为 RNA，DNA 病毒的卫星为 DNA；依据其特性卫星病毒和核酸可分成 6 类（表 14.3）（Bruening，2000）。表中未包括缺损 RNA，它们含有来自辅助病毒的部分序列，已在第 8 章（第Ⅸ节 C 部分）详细讨论过。依赖于外壳的 RNA 复制子（replicon）也在本节介绍，因为它们的序列不同于辅助病毒。

表 14.3　卫星病毒、卫星核酸和依赖于外壳的 RNA 复制子

核酸类型[a]	实例	自主复制[b]	指导蛋白质合成[c]	外壳蛋白[d]
非信使卫星 RNA（C 型）	sCMV RNA	否	否	辅助病毒
非信使卫星 RNA（D 型）	sTRSV RNA	否	否	辅助病毒
信使卫星 RNA（B 型）	BsatTomBRV RNA	否	是	辅助病毒
卫星病毒基因组 RNA（A 型）	STNV 基因组 RNA	否	是	自身编码
卫星 DNA		否	否	辅助病毒
依赖于外壳的 RNA 复制子	ST9aRNA	是	是	辅助病毒

注：a. 卫星类型的定义参见 Mayo 等（1995）；b. 独立于辅助病毒的自主复制；c. 该卫星核酸是否表达一种蛋白质？d. 包裹卫星核酸的外壳蛋白的来源。

伴随特定病毒类群的几种卫星 RNA 具有与类病毒相似的结构特性。这些侵染因子曾被称为拟病毒（virusoid），但该词目前已不常使用。Scholthof 等（1996b）和 Bruening（2000）曾对卫星病毒和卫星核酸做过综述。

看来与卫星相伴随的病毒之间在分类学上并不相关，卫星现象（satellitism）似乎在病毒进化期间已发生过多次。一些病毒含有不止一种卫星，而卫星除了有用于复制的辅助病毒外还可以有其自己的第 2 个卫星。

本节将总结卫星病毒和卫星 RNA 与卫星 DNA 的特性。对其复制方法、诱导或调节病害表达的方式也将加以讨论。

A. 植物卫星病毒

已有 4 种确定的植物卫星病毒，还有一种可能的卫星病毒，它们是已知最小的病毒，称为 A 型卫星，如表 14.3 所示。

1. 烟草坏死卫星病毒（STNV）

STNV 是人们认识的第一种卫星病毒，而且卫星病毒这个词最初被创造出来专门用于描述与 TNV 的 30 nm 等轴粒体相伴随的 17 nm 等轴粒体的（Kassanis，1962）（表 14.4）。STNV 粒体的结构已在第 5 章（第Ⅵ节 B. 1）中描述。辅助病毒 TNV（第 6 章第Ⅷ节 D. 6）的复制独立于其他病毒，通常在田间侵染植物的根。长期以来已知 TNV 的一些培养物含有大量的病毒样粒子。Kassanis 及其同事（Kassanis，1962）发现了直径为 17 nm 的小粒体，现在称为 STNV，依赖于较大的辅助病毒而复制。在卫星和辅助病毒的相互关系中有显著的特异性。已分离出这两种病毒的多个株系，只有部分辅助病毒株系可以激活卫星的特定株系（Uyemoto *et al.*，1968）。特定的 TNV 分离株激活卫星的能力与 TNV 侵染大豆和烟草植株的能力相关，而与它们的血清学关系无关（Kassanis and Phillips，1970）。

表 14.4 卫星及其辅助病毒的特性

卫星				辅助病毒			
卫星病毒	粒体[a]	基因组/nt	外壳蛋白/kDa	辅助病毒	粒体[a]	基因组/nt	外壳蛋白/kDa
STNV-1	球状（18）	1239	21	TNV	球状（28）	3684	30
STNV-2	球状（18）	1245	21	TNV	球状（28）	3684	30
SPMV	球状（16）	826	17	PMV	球状（30）	4326	26
SMWLMV	球状	1168	24	MWLMV	球状（35）	—	33
STMV	球状（18）	1059	17.5	TMV	棒状（300×18）	6395	17

注：a. 括号里的数字表示粒体大小，单位为纳米（nm）。

基于血清学分析、CP 的氨基酸组成成分、寄主范围、真菌介体的特异性以及支持其复制的 TNV 株系，已将 STNV 分为三个主要株系。机械接种后，STNV-1 和 STNV-2 受到易于侵染烟草和菜豆的 TNV 株系的支持。STNV-C 在接种的叶片中不复制但却肯定存在于烟草植株的根中（Rees *et al.*，1970）。

STNV 和 TNV 均由甘蓝油壶菌（*Olpidium brassicae*）的卵孢子传播（第 11 章第Ⅻ节）。传播取决于 4 个因素的适当组合：卫星和辅助病毒的株系、真菌小种以及寄主植物的种类（Kassanis and Macfarlane，1968）。

STNV RNA 的全序列是最早测定的病毒全序列之一[图14.9(A)]。STNV RNA 与 TNV 基因组的序列无显著相似性。STNV 内 RNA 的排列如图 5.21 所示。氨基酸序

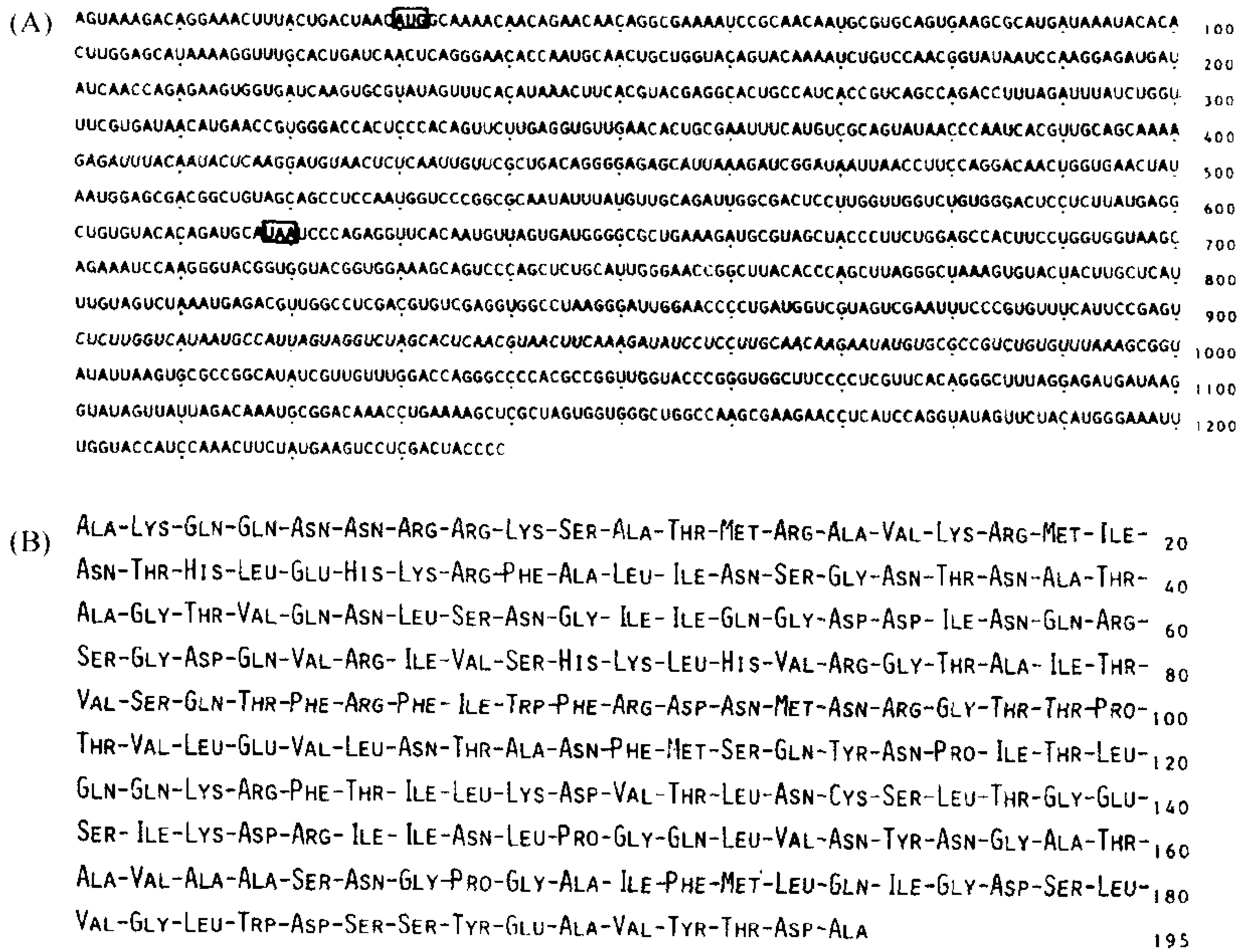


图 14.9 （A）STNV RNA 的核苷酸序列。此处显示的是病毒 RNA 的序列，也结合了 Leung 等（1976）发表的克隆的 cDNA 和 5′端序列。STNV 外壳蛋白起始和终止密码子均用方框标出。（B）由该序列推导的 STNV 外壳蛋白的氨基酸序列。承蒙惠允，引自 Ysebaert 等（1980）。

列根据核苷酸序列推导而来，后者由直接对 STNV 的外壳蛋白的氨基酸测序证实[图 14.9(B)]。这些结果表明 STNV 只编码一种基因产物，即其外壳蛋白（图 14.10）。虽然 STNV-1 和 STNV-2 存在较大的序列变异，但各自只编码一种外壳蛋白。然而，STNV-1 和 STNV-2 的前导序列与 5′端 27 nt 中的 21 个完全相同。同样地，两个株系的 3′UTR 的推测的二级结构也基本相同（Danthinne *et al.*，1991）。

STNV RNA 具有高度的二级结构。据报道这个结构对分子的稳定起作用（Ysebaert *et al.*，1980）。该 RNA 在体内非常稳定，在接种的叶片中没有辅助病毒存在的情况下可存活 10 天（Mossop and Francki，1979a）。这种稳定性使卫星在细胞内脱壳后在辅助病毒侵染细胞之前可存活一段时间。

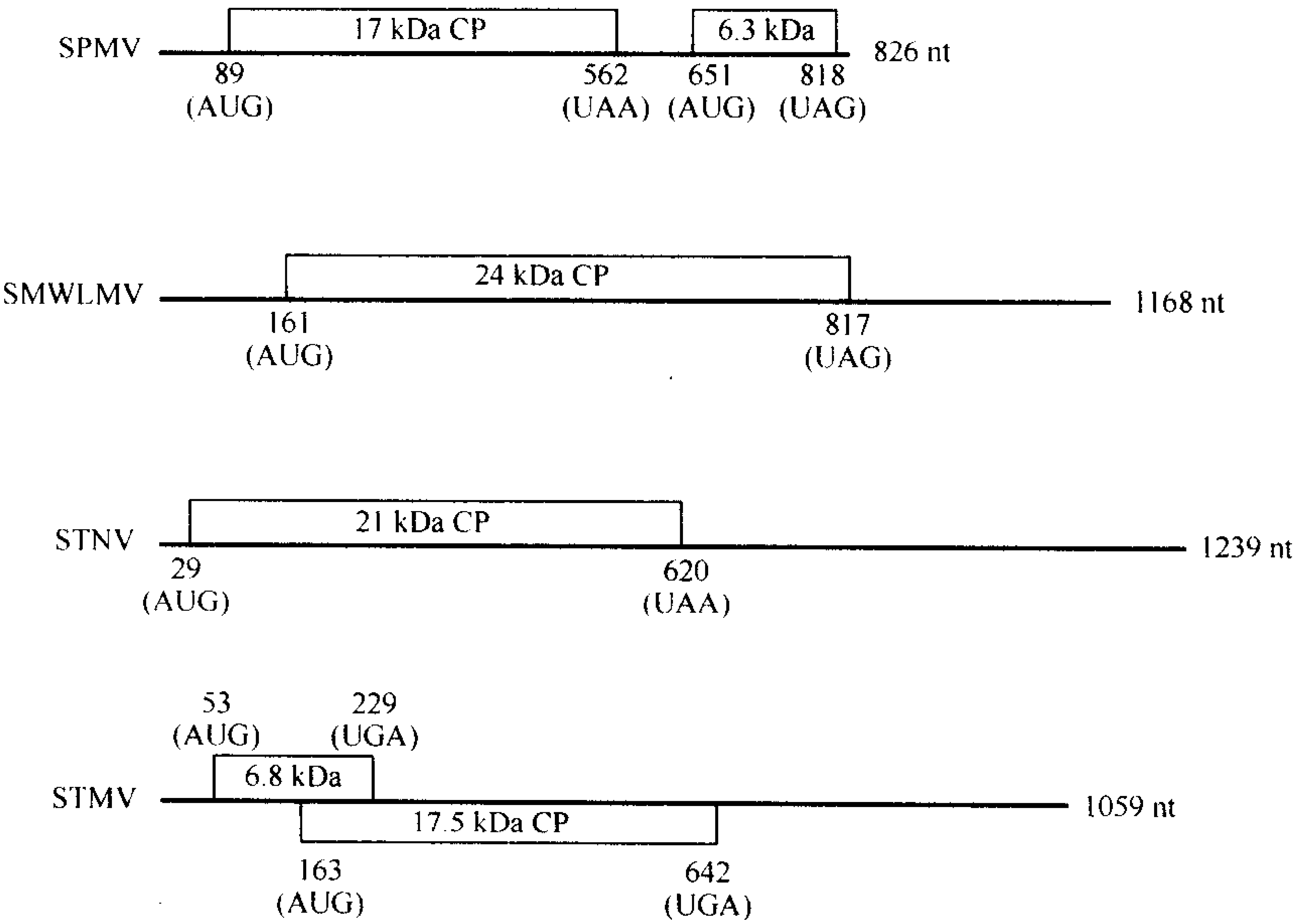


图 14.10　植物病毒的卫星病毒基因组的结构示意图。SPMV RNA 在基因组 5′端编码 17 kDa 外壳蛋白，3′端编码 6.4 kDa 功能未知蛋白。2 个可读框也位于负链上（未显示）。SMWLV 编码 24 kDa 外壳蛋白，TNV 的卫星病毒 STNV-1 和 STNV-2 编码 21 kDa 外壳蛋白。卫星 RNA 3′端非翻译区高度结构化，而这种大量的碱基配对表明它可能是复制、所编码基因的翻译和受外壳蛋白包装所需的顺式作用元件。STMV 在此也用于比较。卫星病毒 RNA 的基因组长度用核苷酸（nt）表示。承蒙版权拥有者（© Springer-Verlag 出版社）惠允，引自 Scholthof 等（1996b）。

关于 STNV 的体内复制了解得很少，但普遍认为 STNV RNA 的复制至少部分是由辅助病毒编码的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶执行的。尚没有证据表明 D 型卫星以滚环方式复制（第Ⅱ节 B.5 部分），推测复制是通过负链以与正链 RNA 病毒相同的方式进行的（第 8 章第Ⅳ节 D 部分）。TNV-A 复制酶蛋白（p23 和 p28）在 CaMV 35S 启动子作用下在原生质体中瞬时表达或在转基因植物中表达均可支持 STNV-2 复制（Andriessen *et al.*，1995），然而，该卫星 RNA 的积累只有在野生型 TNV-A 的 RNA 和 STNV-2 经电激进入原生质体时才能达到 1%的水平，这可能是由于复制酶蛋白质表达水平低或者还需要 TNV-A 编码的另一些蛋白质。

STNV 的大量复制抑制了 TNV 的复制（Jones and Reichmann，1973），这可能与复制酶的竞争有关。在接种体中加入 STNV，会使辅助病毒产生的病斑减小，这可能是由于 TNV 的复制受到了抑制。

STNV 在离体的原核和真核表达系统中唯一翻译的蛋白质是外壳蛋白。在小麦胚体外翻译系统中，当 TNV 和 STNV RNA 混合在一起翻译时，STNV RNA 甚至在过量的 TNV RNA 存在时也能得到优先翻译（Salvato and Fraenkel-Conrat，1977）。应用包含 STNV RNA 5′区不同长度的 DNA 拷贝的重组质粒转录 mRNA，影响不同起始因子需要的序列已在小麦胚的蛋白质合成体系中得到界定（Browning *et al*.，1988）。

STNV 的 5′端与大多数正单链 RNA 植物病毒不同，它既没有 5′帽子结构也没有 VPg，而是 5′-ppApGpUp（Ysebaert *et al*.，1980）。3′端区可折叠形成 tRNA 样结构，含有 AUG 反密码子，但没有证据表明这种结构可以接受甲硫氨酸。与其他植物病毒 RNA 相比，STNV RNA 在体外的原核系统中可有效地翻译，这可能是由于其 5′非编码区包含序列-AGGA-，它是 Shine-Dalgarno 原型序列的一部分，与大肠杆菌 16S 核糖体 RNA 的 3′端的一个区域互补。STNV RNA 的 cDNA 分子插入到质粒后，造成 STNV外壳蛋白在大肠杆菌中的有效翻译，与细菌体外系统中的有效翻译一致（van Emmelo *et al*.，1984）。

2. 黍花叶病毒的卫星病毒（Scholthof *et al*.，1999b）

与 TNV 和 STNV 两者的关系相似，在等轴体病毒 PMV 及其更小的卫星病毒（SPMV）之间也存在同样的关系（图 14.11）（Niblett and Paulsen，1975；Buzen *et al*.，1984）（表 14.4）。PMV 在珍珠粟（pearl millet）上只引起轻微症状，而与 SPMV 同时接种时，通常引起严重的花叶、矮化及种子变小（Masuta *et al*.，1987）。这是由于 PMV 的系统侵染增加，同时 PMV RNA、p8 和外壳蛋白也都增加所致（Scholthof，1999）。

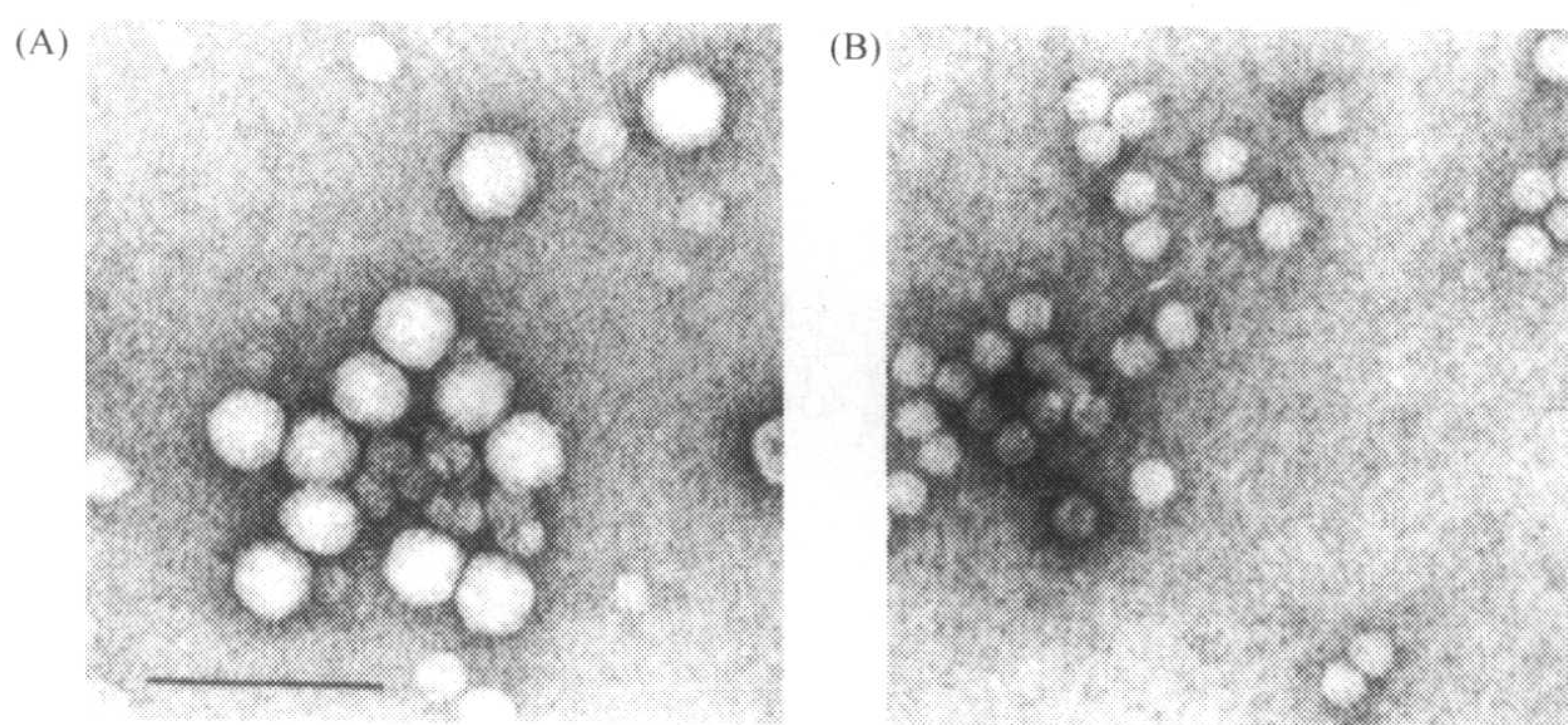


图 14.11　PMV 和它的卫星病毒 sPMV 的电子显微镜照片。（A）病毒粒体直径分别为 30 nm 和 17 nm 的 PMV 和 sPMV 的混合物，从混合侵染的珍珠粟中制备提取。（B）通过蔗糖密度梯度与 109S 的 PMV 分离开的 42S 的 sPMV。标尺为 100 nm。承蒙版权拥有者（© Springer-Verlag 出版社）惠允，引自 Scholthof 等（1999）。

SPMV RNA 的正链具有两个可读框（ORF），5′ORF 编码 17 kDa 的外壳蛋白，下游 ORF 可能编码 6.3 kDa 蛋白质（Masuta *et al*.，1987）（图 14.10）。6.3 kDa 蛋白质是否表达（及其功能如何）还不清楚。SPMV 负链含有两个 ORF，可能编码 7.1 kDa 和 11 kDa 多肽。PMV 和 SPMV 与 TNV 或 STMV 的序列均没有相似性。

PMV 与 SPMV 的 5′端和 3′端仅具有有限的序列相似性。

3. 玉米白线花叶卫星病毒（Scholthof *et al*.，1999b）

MWLMV 是未归类的病毒，大小与 TNV 接近，但两者没有关系。在受侵染植株的根中，发现了小的卫星病毒粒体（Gingery and Louie，1985）（表 14.4）。

SMWLMV 的基因组 RNA 含 1168 个核苷酸，只有一个 ORF，编码 24 kDa 蛋白质（Zhang *et al*.，1991）。与其他卫星病毒 RNA 相似，5′端没有帽子结构，3′端是 CCC，由于 MWLMV 基因组的序列数据很少，还不能与该卫星病毒的序列进行比较。

4. 烟草花叶卫星病毒（Dodds，1988；1999）

Valverde 和 Dodds（1986）描述了与 TMV 序列不同的小 RNA 分子。该 RNA 存在于 TMV 自然分离株 U5 株系（现在称为 TMGMV）中。起初他们认为是卫星 RNA，但是，当 TMGMV 分离方法经过修改后，分离得到一种直径为 17 nm 的二十面体病毒粒体，含有卫星 RNA（图 14.12）（Valverdee and Dodds，1987）（表 14.4）。该卫星病毒与辅助病毒或其他卫星病毒均没有血清学关系。这些实验也是一个很好的例子，说明当描述新分离的卫星 RNA 时需要非常谨慎。当用烟草花叶病毒属的其他病毒作为辅助病毒时，STMV 可以复制，但在自然界只与 TMGMV 相伴随。看来该卫星对于辅助病毒产生的症状也没有任何影响。

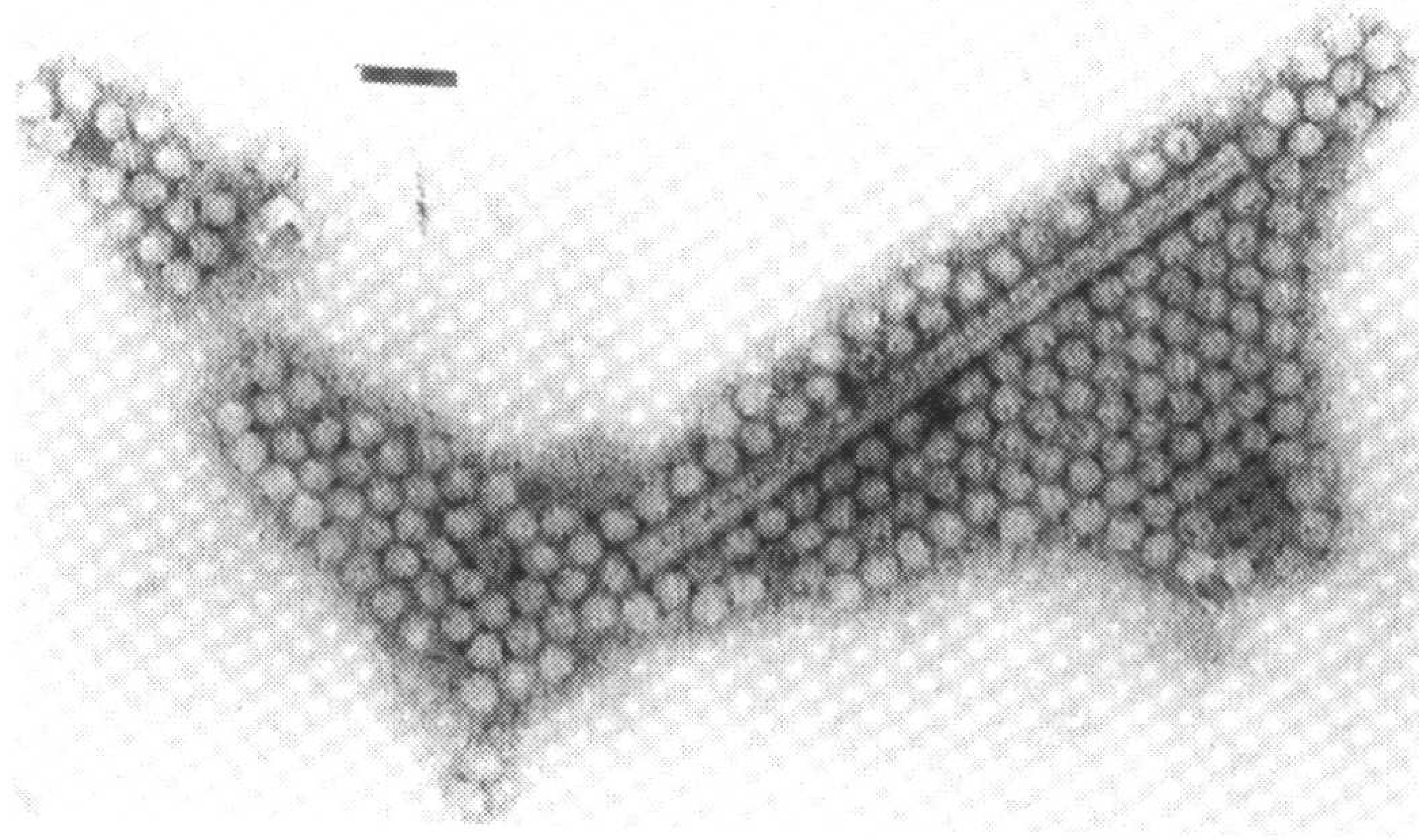


图 14.12　从混合侵染的烟草纯化的 TMGMV 和 STMV 的负染电镜照片，完整长度（300 nm）的 TMGMV 被球形 STMV 病毒粒体（16～17 nm）所包围。标尺为 50 nm。承蒙惠允，引自 Valverde 和 Dodds（1987）。

STMV RNA 的序列早已得到测定（Mirkov *et al*.，1989）。把该序列与 TMGMV 相比较，发现相似性（大约 60%）局限于 3′非翻译区（Solis and García-Arenal，

1990)。卫星 RNA 的 3′端可折叠形成类似 tRNA 的结构，包含两个拟结（pseudoknot），如同 TMV 和 TMGMV 的结构一样（图 4.5）。像 TMV 那样，3′端接受组氨酸而氨酰化（Felden *et al.*，1994；Gultyaev *et al.*，1994），若烟草花叶病毒属中的其他病毒能够利用组氨酸氨酰化则也可以作为 STMV 的辅助病毒。据推测这些相似性反映了该卫星对辅助病毒编码的复制酶的依赖性。

该卫星病毒 RNA 包含 2 个 ORF。5′端编码 6.8 kDa 蛋白质，功能未明；3′端 ORF 编码 17.5 kDa 外壳蛋白。可编码 6.8 kDa 蛋白质的 ORF 并不是侵染所必需的。

STMV 对以烟草花叶病毒属的其他病毒作为其辅助病毒的适应，表现在 5′前导序列中连续 5 个 G 残基（第 61～65 位）中单一 G 碱基的缺失以及 5′核苷酸的一个变化（Yassi and Dodds，1998）。有人认为这种适应不涉及 TMV 复制酶以正链基因组为模板合成负链 RNA 的能力，但涉及从负链合成正链的能力（Dodds，1998）。

B. 卫星 RNA

由表 14.3 可知有 3 类卫星 RNA，其中 A 型为卫星病毒。卫星 RNA 依据大小分类，大的、含 mRNA 活性的称为 B 型（Mayo *et al.*，1995）或亚组 1（Mayo *et al.*，2000b）。更小的、没有 mRNA 活性的再依据其形态分为线性的（C 型或亚组 2）和环状的分子（D 型或亚组 3）。

White 和 Kaper（1989）描述了检测小样品植物组织中的卫星 RNA 的简单方法，这些 RNA 与 4 个植物病毒组的成员相伴随。

1. 大型卫星 RNA（B 型或亚组 1）（Mayo *et al.*，1999）

与其他卫星 RNA 一样，B 型卫星分子也依赖于辅助病毒进行复制和包装，但与其他卫星 RNA 不同的是，在体外、体内均可从单个 ORF 指导蛋白质的合成。到目前为止，已研究的 B 型卫星 RNA 分子不小于 0.7 kb。大多数 B 型卫星（具有前缀“Bsat”）与线虫传多面体病毒属病毒相伴随，另一种还与马铃薯 X 病毒属的 BaMV 相伴随。

a. 番茄黑环病毒的卫星 RNA（BsatTBRV）

TBRV 的一些分离株总伴随一种大小为 1.4 kb 的小分子 RNA，具卫星 RNA 的特性（Murant *et al.*，1973）。卫星 RNA 与辅助病毒粒体外壳蛋白的包装形式多样，因此离心时可以在 $CsCl_2$ 溶液中形成浮力密度不同的各种组分。该卫星 RNA 与辅助病毒一样可以种传，也由该病毒的线虫介体传播（Murant and Mayo，1982）。在田间可以分离到该卫星的不同株系，在辅助病毒株系和卫星 RNA 株系之间存在特异性。BsatTBRV 5′端具有 VPg 结构，3′端为多聚腺苷酸，该卫星不影响辅助病毒的复制，除了在苋色藜上减少坏死斑数量外也不涉及症状的改变（Murant *et al.*，1973）。

BsatTBRV 的第一个全序列长为 1375 nt。该序列含有一个 ORF，具有 5′和 3′非翻译区。3′区包含一段与聚腺苷酸化信号相似的序列（Meyer *et al.*，1984）。依据序列同源性，5 个 BsatTBRV 分离株归为两组，组间的同源性约为 60%，而组内的同源性高得多（Hemmer *et al.*，1987）。所有分离株均包含一个 ORF，可编码 419～424 个氨基酸。数个潜在的氨基酸序列保守区在所有分离株中均相同，包括一个带阳离子的 N 端和几个潜在的磷酸化位点。突变研究表明该蛋白质编码区与 5′和 3′非翻译区对 Bsat 的

复制都是必需的。

在其他线虫传多面体病毒属病毒中也发现了与 BsatTBRV 的基本特征非常相似的卫星 RNA。曾发现在 ArMV 的一些分离自啤酒花的分离株中存在类似小卫星 RNA 的 RNA 分子。有证据表明，与辅助病毒一起复制时，这种 RNA 能够引起啤酒花的相当严重的刺头病（nettlehead）（Davies and Clark，1983）。

有人曾发现 ChYMV 的卫星 RNA 的有趣现象，ChYMV 是意大利南部发生的一种线虫传多面体病毒属病毒。ChYMV-T 株系含有两个 RNA 组分，均有卫星 RNA 特性，杂交实验表明两者之间或这两个 RNA 分子与其辅助病毒基因组 RNA 之间均没有序列同源性（Piazzolla *et al.*，1989a）。这两个卫星 RNA 的序列已得到测定（Rubino *et al.*，1990）。其中一个只有线性分子，长为 1145 nt，包含 3′多聚腺苷酸序列。一个能编码约 40 kDa 多肽的 ORF。5′引导序列为 16 nt，3′非编码区为 40 nt，该 ORF 在体外翻译能产生预期大小的产物；另一个卫星 RNA 含 457 nt，没有足够长的 ORF，在体外没有 mRNA 活性。在感病组织中存在着线状和环状两种分子。该卫星 RNA 含有一个大的保守区域，其序列与线虫传多面体病毒属病毒的其他小卫星 RNA 具有相似性（第Ⅱ节 B. 4. a）。

b. 竹花叶病毒的卫星 RNA（BsatBaMV）

BsatBaMV 长 836 nt，含有与其辅助病毒——马铃薯 X 病毒属的 BaMV 相同的 5′端六核苷酸（hexanucleotide）序列和 3′多聚腺苷酸（Lin *et al.*，1994；Yang *et al.*，1997a）。BsatBaMV 的唯一 ORF 编码 20 kDa 蛋白质，可牢固结合 BsatBaMV 的 RNA，与其他正单链 RNA 分子的亲和性小（Tsai *et al.*，1999）。但是，该 20 kDa 蛋白质不是卫星 RNA 复制所需要的，可被其他报道基因所取代（Lin *et al.*，1996）。

BsatBaMV 的不同株系对基因组 RNA 和亚基因组 RNA 分子的积累、辅助病毒的症状产生等具有不同作用（Hsu *et al.*，1998）。这些作用还因寄主植物的不同而异。

2. 小线状卫星 RNA（C 型或亚组 2）

C 型卫星 RNA 为线状分子，基因组长度通常短于 0.7 kb，并且无 mRNA 活性。

a. 黄瓜花叶病毒属病毒的卫星 RNA（Garcia-Arenal and Palukaitis，1999）

1972 年，法国 Alsace 地区种植的黄瓜发生了毁灭性的坏死病害，以前曾认识到 CMV 与此有关，但不清楚为什么症状是坏死而不是普通的蕨叶症（Putz *et al.*，1974）。据 Kaper 和同事报道（Lot and Kaper，1976），在一些 CMV 株系中存在第 5 种小分子 RNA 组分，该组分不同于 3 个基因组 RNA 和一个亚基因组外壳蛋白mRNA，它不是病毒基因组的成分。Kaper 和 Weterworth（1977）研究发现这个附加的小 RNA 存在于 CMV 的 S 株系培养物中，当将其加入到 CMV 基因组 RNA 时即可导致番茄坏死。他们称这个卫星 RNA 为 CARNA5，认为正是它引起了 Alsace 区的黄瓜坏死病害。在意大利南部也发现由 SatCMV 坏死株系（CARNA5）引起的类似病害（Kaper *et al.*，1990）。虽然 CMV 的多数卫星 RNA 可减轻症状（Palukaitis，1988），但其总体作用取决于卫星 RNA 和辅助病毒株系的组合。

已有数种不同的卫星 RNA 的报道，但是研究最清楚的是 CARNA5（图 14. 13）。它存在于平衡密度梯度离心后 CMV 的各种密度组分中。所以，它可能与 RNA 1 和

RNA 2 包装在一起。也存在于不包含任何 CMV RNA 分子的粒子中，并且每个粒子所含有的拷贝数不同（Kaper *et al.*，1976）。该 RNA 依赖于 CMV 基因组，但其全序列并不与 CMV 基因组显著相关。卫星 RNA 包装于 CMV 蛋白质中可使其由传播 CMV 的蚜虫来传播（Mossop and Francki，1977）。

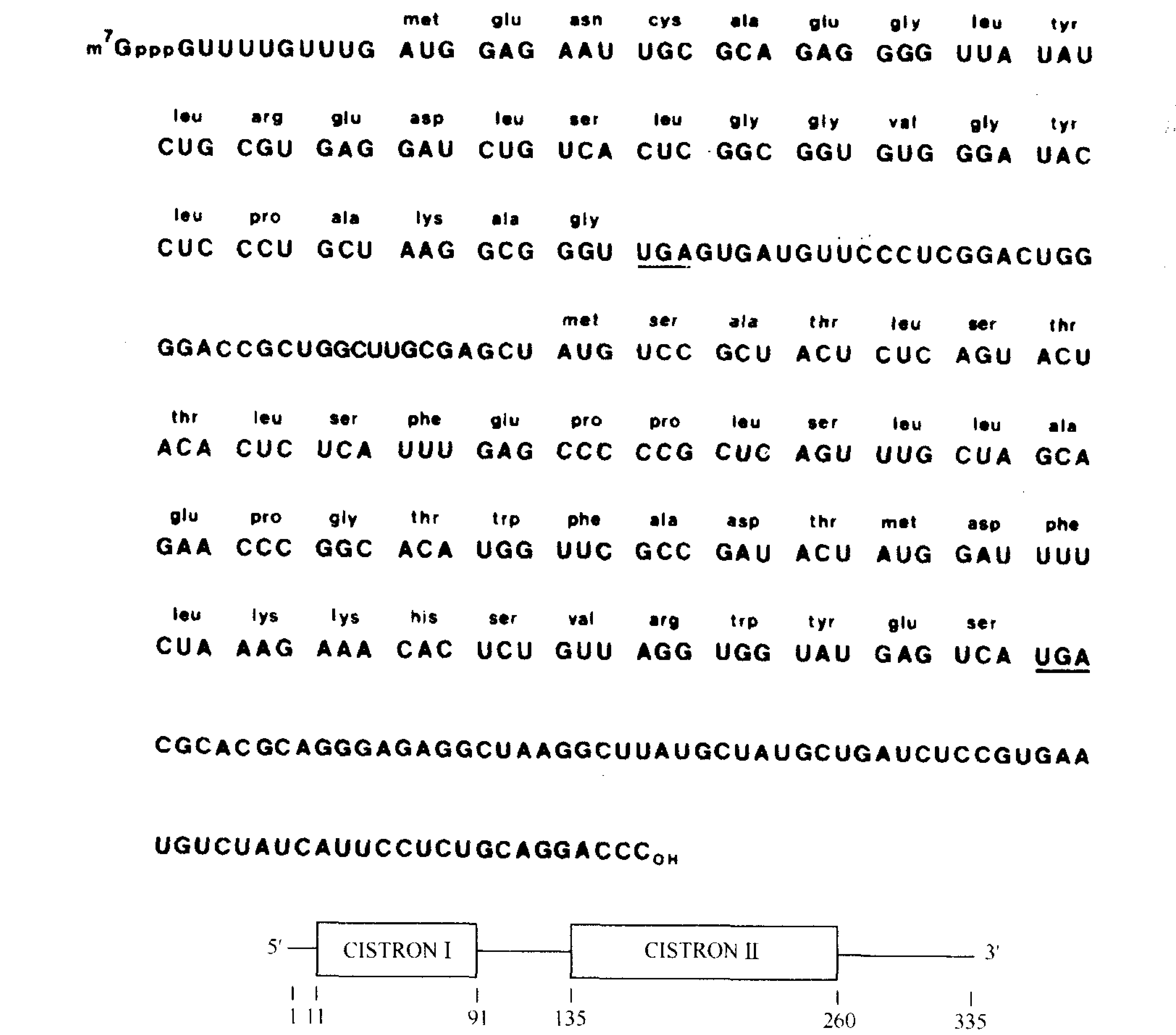


图 14.13 CARNA5（株系 7）的 335 nt 的序列。Richards 等（1978）提出的可能的编码区，承蒙版权许可。

已报道了许多与 SatCMV 的核苷酸序列相关的自然变株（García-Luque *et al.*，1984；Palukaitis and Zaitlin，1984；Hidaka *et al.*，1988），其长度为 330～390 nt。因此，可能多数卫星 RNA 制剂是由序列相近的分子群体组成的。

与辅助病毒 CMV 的基因组 RNA 相似，它们的 5′端具有帽子结构，即 M^7Gppp，3′端含羟基；5′端的 10 个残基与 3′端 6 个残基保守，其他区域也有保守区。卫星 RNA 可能形成大量的二级结构，其结构模型已被提出（Gordon and Symons，1983）。3′端可能存在 tRNA 样结构，但是试图使 RNA 氨酰化的试验没有成功。高度的二级结构可能是 RNA 在体内、体外均极为稳定并且具有相当高的侵染性的原因（Mossop and Francki，1978）。

对于许多CMV株系而言，虽然卫星RNA的量很少，但研究过程中有时也不能去除CMV培养物中的卫星RNA（Kaper *et al.*，1976）。这可能是由于卫星RNA具有的高度稳定性和侵染性所致。在第Ⅱ节B.6部分将讨论卫星RNA对于病害症状的影响。

Masuta等（1988b）应用引起黄化症状的CMV卫星RNA（株系Y）的cDNA克隆的RNA转录物，发现5′端附加的非卫星核苷酸明显降低了卫星RNA的侵染性，这与克隆的病毒RNA转录物的情况相似。

产生的卫星RNA数量差异很大，取决于寄主的种类与辅助病毒的株系。CMV的RNA 1和RNA 2具有高度保守的5′引导序列，可形成部分发卡结构。该保守的5′序列与CMV卫星RNA互补。该卫星RNA序列与基因组RNA 1和RNA 2的5′引导序列的碱基配对可能是卫星RNA影响病毒复制和卫星RNA产生的一种机制（Rezaian *et al.*，1985）。另一方面，研究也发现一种CMV卫星RNA与CMV外壳蛋白基因的33个核苷酸特异性地结合，可能形成特殊的拟结状结构（Rezaian and Symons，1986）。这一发现表明卫星RNA可能具有调节CMV复制的另一种机制。

一些PSV分离株可包含称为PARNA5的卫星RNA，比CMV的任何卫星RNA长15%（全长393 nt），含有与CMV卫星RNA相同的5′端与3′端结构，靠近末端区域的短序列具有相似性（Collmer *et al.*，1985）。但PARNA5具有与一些类病毒序列高度相似的几个区域，并且与RNA正确加工必需的寄主内含子序列也有显著相似性。

b. 番茄丛矮病毒属病毒的卫星RNA

番茄丛矮病毒属（*Tombusvirus*）的多数病毒的粒体含有小卫星RNA。这些RNA分子之间相似性很高，但与辅助病毒的基因组RNA不具相似性（Gallitelli and Hull，1985）。在多数其他系统中，卫星RNA的复制对于辅助病毒而言是株系特异的。相反，番茄丛矮病毒属病毒的卫星RNA可被异源病毒支持，这些病毒通常并没有卫星相随。该卫星RNA的存在可改变病害症状的表现（Hillman *et al.*，1985）。

c. 香石竹斑驳病毒属病毒的卫星RNA

TCV支持一个家族的卫星RNA（Altenbach and Howell，1981）（图8.34），其中两种卫星（D和F）不影响症状，而C致病性强，在萝卜上加重TCV导致的症状。Simon和Howell（1987）用全长cDNA拷贝在体外表达载体上合成了该致病性卫星（RNA-C）的RNA分子。只有与辅助病毒TCV一起接种时该RNA才有侵染性。卫星RNA的cDNA或反义RNA不具侵染性。Altenbach和Howell（1984）检测到一系列至少6种多聚体RNA形式。该RNA多数具相同极性，为被包裹的单体，表明其在多聚体RNA复制时起作用。他们还发现卫星RNA和寄主DNA具有序列相似性，但其意义有待阐明。

TCV的致病性强的卫星C引起人们特别的兴趣，因为不像其他已知的卫星RNA，它与其辅助病毒TCV的基因组具有一个高度同源的区域（Simon and Howell，1986；Simon *et al.*，1988）。RNA C的5′端的189个碱基与更小的非致病性的TCV卫星D RNA整个序列均有同源性。RNA C的其他部分（3′端的166个碱基）与辅助病毒TCV基因组的5′端的两个区域的序列几乎相同。这种有趣的复合分子（composite molecule）结构如图14.14所示，图中也显示了Simon等（1988）通过插入和缺失分析所阐明的功能域。RNA C的30 nt形成的茎环区域和几个模体可以增强复制，表明复制

增强子具模块性质（Simon and Zhang，2001；Zhang and Simon，2001）。因此，至少从结构来看，TCV 的卫星 RNA C 是一个卫星 RNA 和 DI（缺损干扰）RNA 的杂合分子（参见第 8 章第Ⅸ节 B. 2. b）。当用 TCV、卫星 RNA D 和卫星 RNA C 转录物（在 5′端包含无活力突变区）的混合物接种植物时，可得到重组卫星 RNA 分子（Cascone *et al.*，1990）。大约 20 个重组子交界区的序列分析结果支持这种重组的拷贝选择模型（copy choice model）。该模型表明，在复制负链的过程中，复制酶与新生正链分子一起离开模板，在同一个或另一个模板上的两个识别序列中的任一个重新起始合成。

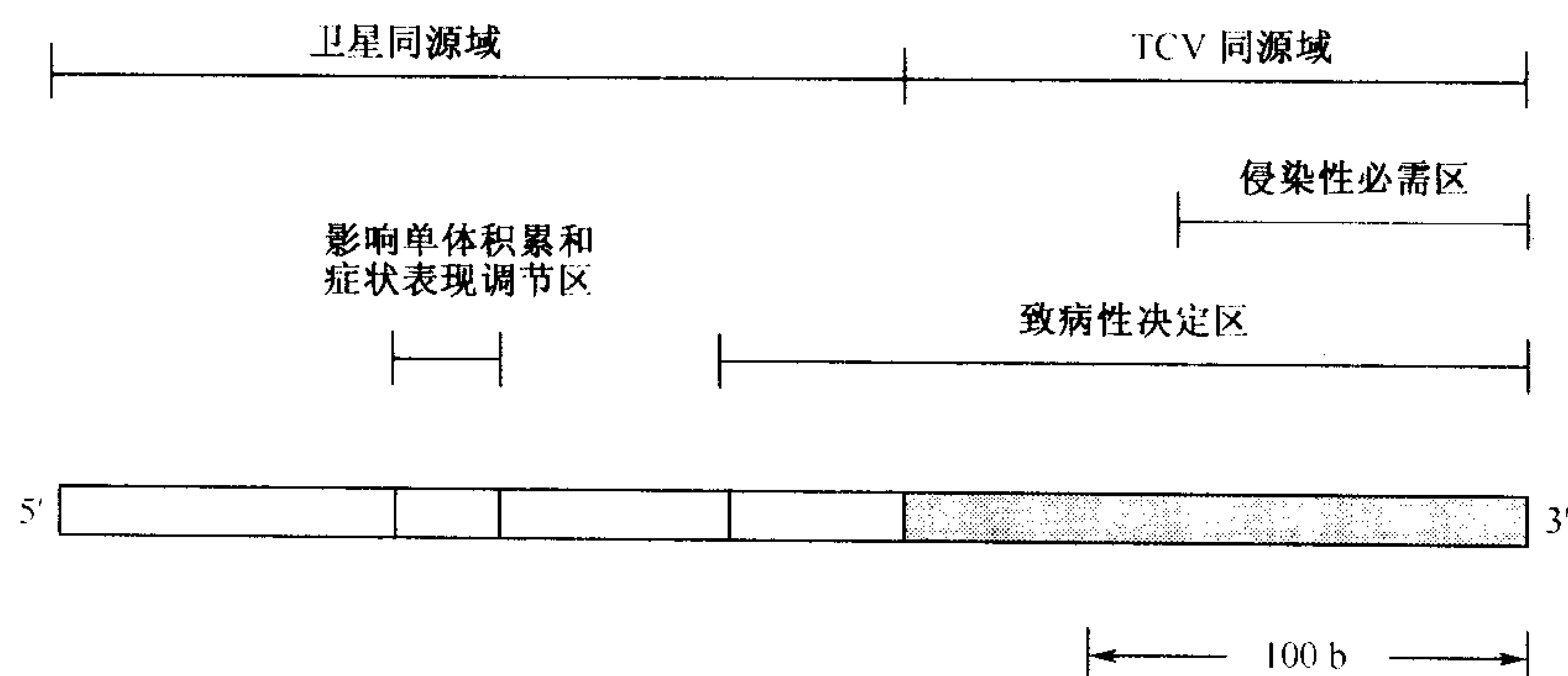


图 14. 14　TCV 的致病性复合卫星 RNA C 的结构域。承蒙版权拥有者（© Oxford University Press）惠允，修订自 Simons 等（1988）。

3. 类似卫星的 RNA

大多数卫星对于其辅助病毒生物学方面的成功并不是必不可少的。然而，从这种情况到卫星 RNA 参与病害的扩展和表现是一个相当小的进化步骤。既然不能认定这些分子对辅助病毒是不重要的，而且在技术上不能看作是卫星 RNA，因此，把它们归为“类似卫星的 RNA”（Mayo *et al.*，1999）。

a. 花生丛簇病毒的卫星 RNA

该卫星 RNA 伴随 GRV（satRNA 或 sGRV），是线性单链 RNA，含有 895～903 个核苷酸，复制依赖于 GRV（Murant *et al.*，1988a；Murant and Kumar，1990）。虽然不同的 sGRV 变株的负链或正链共包括多达 5 个潜在的可读框（Blok *et al.*，1994），但这些可读框都不是卫星 RNA 复制所必需的（Taliansky and Robinson，1997）。

如第Ⅱ节 D 部分所述，sGRV 与两种病毒一起参与导致花生丛簇病，并且是包裹和症状表现所必需的。

b. 豌豆耳突花叶病毒的卫星 RNA（Demler *et al.*，1996a）

在 PEMV 的某些制备物中除两个基因组 RNA 分子外，还发现第三种 RNA（717 nt），其已被鉴定为卫星 RNA（Demler and de Zoeten，1989；Demler *et al.*，1994b）。sPEMV 自身无侵染性，复制需要 PEMV RNA 2 的参与。sPEMV 的 5′端和 3′端序列与 PEMV RNA 2 有一定的同源性，并且其复制也可以由 GRV 支持（de Zoeten *et al.*，1994）。

该 RNA 的存在不影响症状表现、蚜传特性或粒体形态。因此，sPEMV 像真正的卫星 RNA 一样对辅助病毒是完全不必要的，但由于它与 sGRV 的密切关系而归类于此（Demler *et al.*，1996b）。

c. 甜菜坏死黄脉病毒的辅助 RNA（ancillary RNA）

BNYVV 的田间分离株包括 4 个或 5 个 RNA 组分，但是通过机械方式接种到昆诺藜或番杏（*Tetragonia expansa*）上保存的实验室分离株，可缺少三种较小 RNA 中的任一种甚至全部 3 种分子。BNYVV 基因组包括 RNA 1 和 RNA 2（第 6 章第Ⅷ节 H. 13），而 RNA 3、RNA 4 和 RNA 5 与卫星 RNA 类似。它们分别含有一个 ORF，在亲本病毒的田间病害诱发（病理学）中起作用。RNA 3 对病毒的病理学起更重要的作用，而 RNA 4 明显提高了病毒由真菌介体传播的效率。RNA 5 在症状产生和真菌传毒中均起作用（Mayo *et al.*，1999）。

4. 环状小卫星 RNA（D 型或亚组 3）

D 型卫星 RNA 分子小，含有 350～450 个核苷酸，以环状及线状分子的形式存在。

a. 线虫传多面体病毒属病毒的 D 型卫星 RNA

线虫传多面体病毒属的几种病毒支持卫星 RNA 的复制，该 RNA 由辅助病毒的外壳蛋白包装成粒体，这些卫星 RNA 中的一些相对较大，属于 B 型，已在第Ⅱ节 B. 1 中描述过。它们最可能由辅助病毒的复制酶通过正链 RNA 病毒的复制方式来复制（第 8 章第Ⅳ节 D）。另外一些是由完全不同的滚环机制复制的。

烟草环斑病毒的卫星 RNA（sTRSV）

sTRSV 为小 RNA 分子，含有 359 个核苷酸（Buzayan *et al.*，1986d），由与辅助病毒相同的外壳蛋白包裹。每一个粒体含有 12～25 个卫星 RNA 分子（Schneider *et al.*,1972a）。不同的卫星 RNA 田间分离株产生不同的枯斑类型（Schneider *et al.*，1972b）。该卫星 RNA 不能靠自身复制，而且它还干扰 TRSV 的复制；不含有 ORF，因此不能进行体外翻译（Owens and Schneider，1997）。Schneider 和 Thompson（1977）从 sTRSV 侵染的叶片中分离到一个 dsRNA 分子的群体，它们在 TRSV 单独侵染的或健康的组织中不存在。这个多组分的 dsRNA 制剂中各种大小的 RNA 分子质量比预测的双链的 sTRSV RNA 要大得多。电泳分析发现至少有 10 种类型的 sTRSV 序列，其中单体 RNA 最小，但其量最大。从受侵染的组织中提纯的 dsRNA，变性时可得到多至 12 个条带的相似系列的分子，含有正链和负链。此处，被包装的单链卫星 RNA 分子的极性定义为正链。每一个条带分子质量的增加对应于单体卫星 RNA 的大小（Kiefer，*et al.*，1982）。3′端未检测到 poly（A），5′端没有 VPg，而在辅助病毒中存在着这些结构。sTRSV 的 3′端是 2′，3′-环胞苷酸（cytosine 2′，3′-cyclic phosphate），5′端为腺苷。此外，还分离到环状的单体或双体 sTRSV RNA（Linthorst and Kaper，1984）。sTRSV RNA 可能存在类病毒样（viroid-like）碱基配对的二级结构（Buzayan *et al.*，1987）。

在另一些线虫传多面体病毒属病毒中也有类似的卫星 RNA。

b. 禾谷黄矮病毒的卫星 RNA

已发现 sRPV 与黄症病毒科的 CYDV-RPV 相伴随，它能减少辅助病毒在燕麦中的

积累和症状的产生（Rasochova and Miller，1996）。该卫星与D型卫星有相同之处，均有多体线状、环状，具有锤头状核酶序列（第Ⅱ节B. 5b）。与CYDV-RPV相伴随导致主要为线状形式的卫星RNA分子的包裹。sRPV的复制也可由马铃薯卷叶病毒属病毒BWYV支持，但被包裹的卫星RNA主要为环状分子（Rasochova *et al.*，1997）。

c. 南方菜豆花叶病毒属病毒的卫星RNA

从澳大利亚分离的南方菜豆花叶病毒属（*Sobemovirus*）的4种病毒含有呈环状或线状的小分子RNA，其中两种（VTMoV和SNMoV）侵染茄科植物，另外两种（LTSV和SCMoV）侵染豆科植物，已证实小分子RNA具有卫星RNA的生物学特征。辅助病毒可独立复制，而小分子RNA不能复制（Jones *et al.*，1983；Jones and Mayo，1984；Francki *et al.*，1986a）。卫星RNA大小为325～390 nt，能以线状或环状形式被包裹。其序列与辅助病毒的RNA分子没有相似性。这些卫星RNA的复制，可由南方菜豆花叶病毒属的其他病毒（包括一些不含卫星的病毒）所支持。

一个更小的卫星RNA（220 nt）与南方菜豆花叶病毒属的另一种病毒RTMV相伴随（Collins *et al.*，1998）。

这些卫星RNA的性质在某种程度上像类病毒（Francki，1985），有时称为拟病毒。然而，它们的热动力特性以及自体切割的能力与类病毒（可能ASBVd除外）不同。解链时像随机的碱基序列一样，而不像类病毒那样具有协同性（co-operativity）（Steger *et al.*，1984）。这4种卫星RNA均具有一段相同的序列GAUUUU，位置相同，处于环结构中（Keese *et al.*，1983）。LTSV的加拿大分离株和澳大利亚分离株之间的序列同源性为80%（AbouHaudar and Paliwal，1988）。

这些RNA的生物学特性毫无疑问属于卫星RNA，但有些特性，尤其是其小分子、环状、高度碱基配对与无mRNA活性，又像类病毒（Francki，1985）。一个序列片段GAAAC，存在于类病毒的中心区，也存在于与侵染茄科植物的病毒相伴随的卫星RNA的相似位置（Keese and Symons，1987）。

5. 卫星RNA的复制

在上一节中，不同的卫星RNA是依据其核苷酸序列长度、RNA的形状、编码能力以及相伴随的辅助病毒来分类的。这可能不是从功能角度来考虑小RNA分子。日益明显的是，卫星RNA的复制方式不同，据此可将大多数卫星RNA分为两类。Piazzolla等（1989a）建议将包含与辅助病毒相似的5′端和3′端结构、复制依赖于辅助病毒RNA复制酶的卫星RNA归为一类；第二类采用滚环复制方式，并且其复制依赖于辅助病毒的某种其他功能。这种分类方法打破了依据辅助病毒的分类地位的界限。确实，Piazzolla等（1989a）和Rubino等（1990）曾分别描述两类卫星RNA中的一种，它们均依赖于ChYMV（第Ⅱ节B. 1. a）。

有关TCV RNA C中存在的复制增强子的介绍可参见第Ⅱ节B. 2. b部分。

a. 末端结构与辅助病毒相似的卫星RNA

该类群的代表为CMV和TBRV的卫星RNA，现将其复制的特征现将总结如下。

i. 末端结构

CMV 卫星 RNA 与 CMV 一样含 5′帽子结构和 3′羟基。sTBRV 与 TBRV 一样具有 5′VPg 和 3′poly（A），这些与辅助病毒的相似性表明卫星 RNA 与其辅助病毒采用相同的复制方式。

位于 TCV satRNA C 负链的 5′端 41 nt 的小 RNA 元件已被证明对于正链合成是非常重要的（Guan *et al.*，1997，2000）。该元件中 14 个核苷酸中的 10 个是严格必需的，表明这些一级序列对于 RNA 积累是必不可少的。

TCV 和相伴随的 satRNA 在 3′端具有相似但不完全相同的发卡结构，且末端序列为 CCUGCCC-OH，形成单链尾（Carpenter *et al.*，1995；Caepenter and Simon，1996a，b；Nagy *et al.*，1997）。发卡结构对于该 satRNA 的复制是必需的，但不需要像野生型的结构那样稳定（Stupina and Symon，1997）。

ii. 可读框的存在

已测序的该类卫星 RNA，含有一个或两个可读框（ORF）。CMV 的一些卫星 RNA 含有两个 ORF（图 14.13），另一些则含有一个 ORF（Avila-Rincon *et al.*，1986）。Owens 和 Kaper（1977）采用小麦胚体外系统研究 CARNA5 分离株的翻译，发现可产生两种分子质量分别为 5.2 kDa 和 3.8 kDa 的多肽。在活体中尚未检测到这两种多肽，所以其功能还不清楚。体外翻译可受到 7-甲基鸟苷-5′-单磷酸的抑制，这是可以预料到的，因为 CARNA5 的 5′端有帽子结构。

sTBRV 的所有变株均含有单一的 ORF，据推测可编码一个含 419～424 个氨基酸的蛋白质，一些区域的氨基酸序列完全相同（Hemmer *et al.*，1987）。这些特征有力地说明 ORF 具有一定的功能，但在症状表现方面是否起作用仍然不明确。这些卫星 RNA 在小麦胚中翻译出了一个大小约为 48 kDa 的多肽，接近其编码潜力的极限（Fristch *et al.*，1980）。该蛋白质在辅助病毒的 RNA 1 和 RNA 2 存在或不存在时均可产生（Fristch *et al.*，1978）。在含有卫星 RNA 的 TBRV 侵染的原生质体中，可检测到相同大小的蛋白质，但没有卫星 RNA 时则不能检测到该蛋白质。

iii. 以单位长度负链为模板的 RNA 复制

下列一系列证据有力地表明 CMV satRNA 的复制是通过单位（基因组）长度的负链模板而完成的：

• Kaper 和 Diaz-Ruiz（1977）从 CMV 侵染的烟草中分离到的 4 种 dsRNA 与 4 种 CMV ssRNA 相对应，另外分子质量约为 220 kDa 的片段与 CARNA 5 的复制型相对应。Takanami（1977）在原生质体研究中也得到类似的结果，即单位（基因组）长度的 dsRNA 的大量积累。

• 用^{32}P 标记的两条链的动力学研究也表明在侵染早期产生过量的正链，双链 satRNA则在后期积累（Piazzolla *et al.*，1982）。

• CARNA5 和基因组 RNA 3 的双链形式在其负链 3′端含有未配对的鸟苷酸，这是一些病毒的复制型的特征，表明病毒和卫星 RNA 采用相同的复制机制（Collmer and Kaper，1985）。

• Baulcombe 等（1986）和 Masuta 等（1989）构建了含 CMV 卫星 RNA 的 cDNA 拷贝的质粒，通过土壤杆菌导入烟草，当用 CMV 接种转化的植株时可产生具生物活性

的 satRNA。转化单体和聚体 DNA 的植株在接种 CMV 后症状表现均未延迟，因此，单体形式与二聚体一样在复制中是有效的。

iv. 对辅助病毒的依赖性

Linthorst 和 Kaper（1985）发现 CARNA5 在原生质体中没有辅助病毒存在时不能复制。该研究结果表明卫星 RNA 依赖于辅助病毒的一些复制功能，而不只是限于包裹和在植物体内的移动。用 CMV 的 RNA 1 和 RNA 2 接种烟草的表皮细胞原生质体，可诱导合成病毒的 RNA 复制酶。将卫星 RNA 加入到这种原生质体时可得到复制（Nitta *et al.*，1988）。

以前的证据充分表明这种卫星 RNA 的复制依赖于辅助病毒的复制功能。因此提出了这些卫星 RNA 可能编码的多肽的功能问题。Fritsch 等（1978）认为这种多肽可能调节寄主复制酶的活性，使之有利于卫星 RNA 的复制。

b. 通过滚环方式复制的卫星

这一类包括 D 型卫星 RNA，sTRSV 不存在可检测的 mRNA 活性（Owens and Schneider，1977）。核酸序列分析也表明它们不包含足够长度的 ORF。没有确切的证据表明为什么这类卫星 RNA 也依赖于辅助病毒复制。然而，有足够的证据表明它们是通过滚环方式来进行复制的。该复制方式涉及 sTRSV RNA 的多聚体串联重复序列的中间体（Kiefer *et al.*，1982；Branch and Robertson，1984）。

如第Ⅱ节 B. 4. a 部分所述，在受侵染的组织中存在着 sTRSV 的环状或多体形式。在受侵染的组织中，核酸提取物中存在大量的环状单体（Linthorst and Kaper，1984）。但在包裹的病毒粒体中只发现线状分子。

在体外，sTRSV 的双体或三体形式经自体切割形成具有生物活性的单体分子，含 359 个核苷酸（Prody *et al.*，1986）。该反应由 Mg^{2+} 及其他二价离子催化。自体切割过程看来是在腺苷残基和相邻的胞苷酸的 2′-羟基之间的磷酸转移反应，产生了 5′-羟基末端腺苷酸和 3′胞苷酸 2′,3′-环磷酸二酯基团。如前所述，这些末端结构是单体（monomeric）RNA 的典型特征。在合适的体外条件下，这一过程在非酶促反应中是可逆的。连接反应可恢复原来的化学键。Sheldon 等（1990）对卫星 RNA 的自体切割进行了综述。

据推测这些类病毒样卫星 RNA 可形成锤头状的自体切割的结构域（图 14. 15），与 ASBVd 的结构（图 14. 6）很相似。

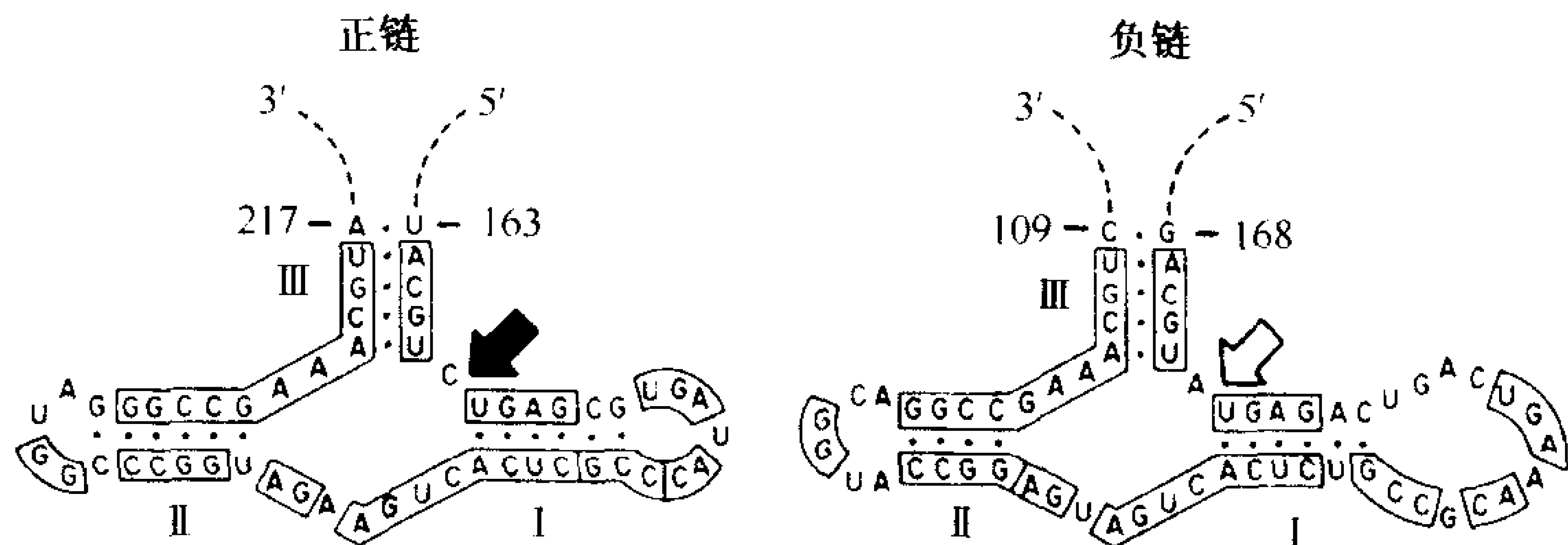


图 14. 15　LTSV 类病毒样卫星 RNA 的锤头状结构的自体切割结构域，箭头表示自体切割位点。正链和负链的保守核苷酸用框图表示。经版权拥有者（© Elsevier Science 出版社）惠允，引自 Forster 和 Symons (1987)。

sTRSV 负链 RNA 的多聚体多核糖核苷酸（multimeric polyribonucleotide）在距正链的自切割位点 48 个残基处的 A-G 键也可以自体切割（Buzayan *et al.*，1986b）。sTRSV 负链 RNA 也会发生非酶促的体外连接反应，并且比正链的连接反应速率高得多。该连接反应是自体切割反应的逆反应（Buzayan *et al.*，1986c）。

sTRSV 正链 RNA 的切割反应是不长于 64 个卫星核苷酸的核心序列的一种特性，该中心序列包含可被切割的键（Buzayan *et al.*，1986a）。对以类病毒样方式复制的卫星 RNA 序列，如 sTRSV RNA 的几个分离株之间（Buzayan *et al.*，1987）以及 ArMV 的卫星 RNA 与 sTRSV 进行序列比较（Kaper *et al.*，1988b），结果表明参与连接反应的线状形式的临近 5′端和 3′端或环状形式的切割位点的序列是高度保守的。在更靠近中心区的序列中有各种明显的变异，包括单碱基的缺失与插入、碱基替换和反向重复的序列，表明曾发生过序列重组。

对 VTMoV 的卫星 RNA 的环状或线状形式进行标记的动力学表明线状分子是环状分子的一种前体（Hanada and Francki，1989）。在侵染的细胞中看来存在着大量未包裹的卫星 RNA。

6. 症状调节的分子基础（Collmer and Howell，1992；Roossinck *et al.*，1992）

如第Ⅱ节 B. 2. a 部分所述，卫星 RNA 可能与田间严重病害的暴发有关。另外，由于卫星 RNA 分子小以及易于从田间或实验室得到其序列变株，因此适于进行分子生物学研究。由于这些原因，人们曾希望通过研究卫星 RNA 的分子结构与其对植物病害作用的相关性以便理解病害诱导的分子基础。迄今已获得的结果尚难于解释。这并不令人惊奇，因为，如下所述，有多个因子参与了相关过程。

TCV 外壳蛋白参与由 satRNA C 诱导的症状变化，而 satRNA C 依赖于供试的 TCV 衍生物。通常，satRNA C 使 TCV 侵染的症状变得更严重。但就 TCV 突变株（其外壳蛋白 ORF 由相近的病毒 CCFV 的相应序列所替换）侵染的植物而言，satRNA C 的存在可减轻症状（Kong *et al.*，1995）。接种 7 天或 10 天后，当 satRNA C 存在时，接种叶片中 $TCV\text{-}CP_{ccfv}$ 的量减少 80%，在未接种的叶片上检测不到病毒 RNA（Kong *et al.*，1995，1997b）。TCV 突变株（其外壳蛋白 ORF 的起始密码子由 AUG 突变为 ACG）导致的症状也因 satRNA C 而减轻（Kong *et al.*，1997b）。由此看来，是外壳蛋白而不是其 RNA 编码序列作为病毒的决定子影响由 satRNA C 诱导的症状。satRNA C 参与症状调节的区域已被定位于 3′端的 53 个碱基，它们形成可结合外壳蛋白的茎环结构（Wang and Simon，2000）。

a. 卫星 RNA 诱导的病害症状的变异

CARNA5 的生物学效应取决于寄主植物。在烟草中，产生大量的卫星 RNA 会使 CMV 的量显著减少，症状减轻（Kaper and Tousignant，1977）。其他寄主上的病害症状也可能会受到抑制（Waterworth *et al.*，1979）。相反，如第Ⅱ节 B. 2. a 部分所述，如果将 CARNA5 与 CMV 一起接种番茄后，会导致产生致死性的坏死症状。图 14.16 显示 CARNA5 在番茄和辣椒中所起的相反作用。

另一种伴随 CMV 的卫星 RNA 在田间引起白叶病（Gonsalves *et al.*，1982）。当与 CMV 的一些株系同时接种时，另一种不同的 CMV 卫星 RNA 则引起症状减轻



图 14.16　CMV 的症状受到其卫星 CARNA5 的调节。上排植物只接种病毒；下一排植物接种病毒和 CARNA5。左边的 Tabasco 辣椒植株上 CARNA5 减轻症状；右边的番茄植株上，CARNA5 引起坏死。承蒙版权拥有者（© CRC 出版社）惠允，引自 Kaper 和 Collmer (1988)。

(Mossop and Francki，1979b)；而与 CMV 的另一些株系一起接种则卫星 RNA 对症状不起作用。然而，当与辅助病毒 CMV 一起接种时，CMV 的另一种卫星 RNA（Y 株系）在一些（并非全部）种类的供试烟草中引起明显的叶片黄化（Takanami，1981）。另一方面，将卫星 RNA 与 CMV 的一个株系同时接种可诱导番茄的致死性坏死，而与另一株系同时接种却不能诱导坏死（Masuta *et al.*，1988a）。

White 和 Kaper（1987）系统研究了在 52 种番茄属植物材料（生态型）中 CARNA5 和 CMV D 株系的效果。引起番茄（*L. esculentum*）品种 Rutgers 致死性坏死症的这一组合，在许多种植物上只引起轻度花叶。同种植物的不同生态型中，症状的变化亦很大。因此，虽然多毛番茄（*L. hirsutum*）的大多数生态型不出现坏死的植株，但在另一种生态型上却可能导致 100%的植株坏死。

症状调节并不局限于伴随 CMV 的卫星 RNA。例如，GRV 的卫星 RNA 在很大程度上与花生丛簇病（rosette disease）的症状形成有关（Murant *et al.*，1988a）。对 VTMoV和其卫星 RNA 也是如此。花生丛簇病有两种主要症状：褪绿斑驳和绿丛簇。有时也可发现轻褪绿和轻斑驳症状，这些症状的不同取决于植物中存在的卫星 RNA 或卫星 RNA 复合物（Murant and Kumar，1990）。

总之，上述这些现象和其他一些结果证实，当存在卫星 RNA 时，病害的结果取决于辅助病毒的株系、卫星 RNA 株系以及寄主植物种和品种之间的相互作用。环境条件无疑是第四个因子。

b. 卫星 RNA 之间的干扰作用

Jacquemond (1982) 研究发现幼龄番茄植株受 CMV 和卫星 RNA 侵染后产生轻的症状，能使其抵抗通常可引起致死性坏死的卫星 RNA 的挑战接种。Yoshida 等（1985）也得到类似的结果，卫星 RNA 在病害防治中的应用将在第 16 章（第Ⅳ节 B）加以讨论。

c. 与症状调节相关的核苷酸序列

Kaper 等（1988a）比较了在番茄上产生坏死的 9 个 CARNA5 变株和不产生坏死的 5 个变株的序列。ORF 1 的序列（图 14.13）在所有产生坏死的株系中是完全保守的，但在非坏死株系中不保守。这表明，推断的 ORF 1 翻译产物在引起坏死中起作用。然而，Collmer 和 Kaper（1988）采用定点诱变清除 ORF 1 的起始密码子 AUG 来直接研究该问题。这样的突变体保留了引起坏死的能力。表明 ORF 1 的蛋白质产物不参与坏死反应。比较 6 个 CMV 卫星 RNA 的核苷酸序列，发现只有某些核苷酸变化会导致寄主反应的改变和不同病害反应（如黄化或坏死），这可能与卫星序列的不同结构域有关（Palukaitis，1988）。

几位研究人员曾采用 cDNA 克隆来构建体外重组的 RNA 基因组以便研究卫星 RNA 的功能域。因此，Kurath 和 Palukaitis（1989a）从 3 个 CMV 卫星 RNA 侵染性克隆构建了 6 个重组卫星 RNA 的基因组。结果表明导致番茄褪绿的结构域位于这些 RNA 5′端的 185 个核苷酸，而导致坏死的结构域位于 3′端的 150 个核苷酸。Devic 等（1989）采用类似的方法，发现 CMV 卫星 RNA Y 株系的症状决定子位于第 1～129 位核苷酸之间，而在番茄中引起致死的决定子位于 3′端，在第 129 位核苷酸之后。Masuta 和 Takanami（1989）的实验表明在 Y 卫星中在第 100～200 个核苷酸形成的二级结构可能参与褪绿症的诱发。

在番茄上减轻 CMV 症状的 WL 1-sat 的序列与所有的产生坏死的卫星 RNA 在保守的 3′区域中 3 个位置的核苷酸不同。Sleat 和 Palukaitis（1990a）采用定点诱变法，将可减轻症状的株系中的 3 个位点都突变成坏死株系中的核苷酸后，在番茄中产生了致死性坏死。如果只将 3 个核苷酸中的两个突变成坏死株系中的核苷酸，则不会发生坏死。

如上所述，CMV 的 Y-satRNA 在烟草上引起鲜黄色花叶症。当与其他卫星株系比较时，发现 Y-satRNA 具有一个独特的结构域（在第 100～200 残基之间，Y 区）对黄化症状的表现起作用（Masuta and Takanami，1989；Kuwata *et al.*，1991）。Y 区有一个序列模体（sequence motif）与 $tRNA^{Glu}$序列大范围互补，而 $tRNA^{Glu}$在叶绿素的生物合成的第一步发挥辅因子的功能（Masuta *et al.*，1992）。因此，褪绿可能因该序列起着一种反义 RNA 作用而引起。

与病害调节相关的一种特别有趣的卫星 RNA 是 TCV 的致病性卫星 RNA，如图 14.14 所示。该卫星的其他非致病性（无毒，avirulent）的株系（如 F 株系）缺少来自辅助病毒 TCV 基因组的 3′端序列。为证实该结构域决定着毒性（致病性），Simon 等（1988）构建了嵌合的卫星 RNA，主要由 F 株系的 5′端序列和致病性卫星 C 的 3′端结构域组成。其他构建物包含了不同位点的插入或缺失。用这些 RNA 试验，得出的结论是：TCV 的 3′序列包含的一个区域对侵染性是必不可少的，一个较大的重叠区决定着毒性（图 14.14）。卫星同源序列域包含着可影响单体积累和症状调节的区域。

从这类研究中可以得到一个大致的结论：卫星 RNA 引起的症状变化取决于 RNA 核苷酸序列的变化。迄今为止，还没有明确的证据表明这种变化是由卫星 RNA 翻译的多肽调节的。实际上，不含有编码能力的 ORF 的 RNA 在症状调节中的作用也存在差异。病害调节很可能是卫星 RNA 与下述大分子发生的特异性相互作用引起的：①辅助

病毒 RNA；②寄主 RNA；③病毒编码的蛋白质；④寄主蛋白质；或者①～④的任意组合。CARNA5 对 CMV 导致的番茄症状的调节包括辅助病毒支持卫星复制的功能，以及卫星自身的功能（Matthews，1991）。对于 CMV 的卫星 RNA 引起烟草系统性坏死的原因，也可得出类似的结论（Sleat and Palukaitis，1990b）。通过核酸杂交可将 CMV 株系分成两个亚组。由卫星 RNA 引起的褪绿只发生于该病毒的亚组Ⅱ株系，而且看来与 CMV 的 RNA 2 有关。

目前还不能揭示病害诱导过程中重要的相互作用的分子基础，因而相关的卫星 RNA 之间核苷酸序列的差异也不能得到充分解释。

7. 卫星 RNA 和缺损 RNA 的嵌合体

传统观点认为卫星 RNA 和缺损 RNA（defective RNA）的差别在于后者从辅助病毒序列中产生，前者与辅助病毒序列很少或几乎没有序列相似性。然而，一些病毒侵染与依赖于辅助病毒的 RNA 相关，该 RNA 的部分序列看来来自于辅助病毒，部分序列是独特的。如上所述，TCV 的 RNA C 的 356 个核苷酸中，5′部分与 TCV 的具有 194 个核苷酸的真正卫星 RNA 一致，而其 3′区段与 TCV 基因组 RNA 的 3′序列一致。在 5′和 3′之间，含有 TCV 基因组的另一个特异性片段。

从番茄丛矮病毒属病毒序列构建了可复制的人工卫星 RNA-缺损 RNA 杂合分子（Burgyan *et al.*，1992）。这类人工分子和 RNA C 均可改变辅助病毒的滴度和症状。

C. 卫星 DNA

伴随 DNA 病毒的第一个卫星 DNA 分子是从澳大利亚北部分离的菜豆金色花叶病毒属病毒 ToLCV 中发现的，为含有 262 个核苷酸的环状单链 DNA（Dry *et al.*，1997）。SToLCV 的复制依赖于辅助病毒的复制相关蛋白质，并由辅助病毒外壳蛋白质包裹，不含有明显的 ORF，唯一与辅助病毒具有显著序列相似性的序列是推定的具有茎环结构的两个短的模体：在所有的双生病毒中均保守的 TAATATTAC，以及与推断的 TLCV复制相关蛋白质结合的模体相同的序列 AATCGGTATC（第 8 章第Ⅷ节）。SToLCV 的复制可由其他双生病毒，如菜豆金色花叶病毒属的 ACMV、TYLCV 和曲顶病毒属的 BCTV 支持。

其他单分体的菜豆金色花叶病毒属病毒也具有几个非病毒的 ssDNA 与其相随。CLCuV 和 ATVV 均随有与矮缩病毒科病毒类似的组分（Mansoor *et al.*，1999；Saunders and Stanley，1999）。这个组分与编码复制相关蛋白（Rep）的矮缩病毒科病毒的组分相似（第 8 章第Ⅷ节 E），也需要辅助病毒来帮助复制。它含有上述的双生病毒的保守序列。在 AYVV 侵染的植物中，还存在着另一种环状 ssDNA—— DNA β，只有辅助病毒 DNA A 的一半大小（1374 nt）（Saunders *et al.*，2000）。除双生病毒中保守的序列 TAATATTAC 外，其他序列与 AYVV 几乎没有同源性。DNA β 依赖于 AYVV 进行复制，由 AYVV DNA A 编码的外壳蛋白包裹，这是卫星的典型特征，藿香蓟（*Ageratum conyzoides*）的黄脉症状依赖于 AYVV 的 DNA A 与 DNA β 的复合侵染，与矮缩病毒科病毒类似的卫星对症状的产生没有影响（Saunders *et al.*，2000）。

D. 依赖于复合体的病毒

如上所述，卫星病毒和卫星 RNA，依赖于辅助病毒来复制，卫星 RNA 也需要辅助病毒来包裹。幽影病毒属（*Umbravirus*）病毒能自主复制，但需要另外一种病毒来完成包裹（第 2 章第Ⅲ节 Q. 20）。对于花生丛簇病的复合症而言，卫星 RNA 也起作用。花生丛簇病是由两种病毒（黄症病毒属病毒 GRAV 和幽影病毒属病毒 GRV）以及卫星 RNA sGRV 的复合体引起的。GRV 和 sGRV，由 GRAV 的外壳蛋白包裹，该外壳蛋白介导蚜虫传毒。sGRV 对 GRV 的包裹和蚜传是必不可少的（Robinson *et al.*，1999）。而且，丛簇的不同株系引起的褪绿或绿化症状是由 sGRV 控制的（Murant *et al.*，1988a；Murant and Kumar，1990）。

豌豆耳突病也是由黄症病毒属病毒 PEMV-1 和幽影病毒属病毒 PEMV-2 复合侵染引起的（第 2 章第Ⅲ节 P. 3）。PEMV-2 有一个卫星 RNA（sPEMV）与之相随（第Ⅱ节 B. 3. b），虽然 sPEMV 与 sGRV 有序列相似性，而且辅助病毒可支持这两种卫星但对 PEMV-2 的包裹看来不起作用（Demler *et al.*，1996b）。

E. 讨论

基于卫星病毒和卫星 RNA 与辅助病毒形成特异的相伴随情况，这就提出两个问题：它们如何进化？它们的自然功能是什么？关于卫星分子的进化将在第 17 章（第Ⅻ节 C）中讨论。关于其功能有两种可能性：卫星分子是“分子寄生物”或者它们在辅助病毒的生物学中具有有益的作用。作为分子寄生物，卫星分子与辅助病毒竞争复制所需要的材料。然而这可能并非对辅助病毒不利。卫星引起症状减轻可能有利于寄主的生存从而使辅助病毒受益。而诱发更严重症状的变株，如一些 CARNA5 分离株，可能在自然条件下的选择中被淘汰，因为杀死寄主会限制其辅助病毒的传播。Kassanis（1962）认为卫星病毒（和卫星核酸）可以改变寄主细胞的代谢，使其对于辅助病毒的复制更能忍受。

如果在第Ⅱ节 D 中所述的病毒（和卫星）的复杂联合（complex association）反映了卫星进化的早期阶段，我们还可预见列由此而来的其他方面的优势。例如，PEMV-2 可促进局限于韧皮部的 PEMV-1 发生全株系统性转移，这样有助于病害复合体经昆虫传播。人们可以预见 PEMV-2 会失去其自主复制的能力，而由 PEMV-1 提供该特性。同样地，花生丛簇病复合体需要 sGRV 的存在来包裹其各个组分，这对昆虫传毒是非常必要的。

第15章　植物病毒的分析、检测和诊断方法

第Ⅰ节　导言

病毒检测几乎是所有病毒学研究的基础。对同一材料中的病毒，依据病毒的不同特性同时采取两种或两种以上的检测方法不仅非常实用，而且对很多实验来说也是必需的。病毒的鉴定和病毒病的诊断问题涉及检测技术的应用，因此，这一章中也包括有关技术方面的问题。有些技术用于检测，有些技术用于诊断，还有些技术既可用于检测又可用于诊断。过去二十多年里，分子生物学的发展为病毒检测和诊断提供了更多的技术。能够在常规条件下诊断病毒病是发展有效控制这种病毒病技术的基础（第16章）。

应用本章提到的实验方法时，可以区分至少5种情况：第一种，在纯化病毒的过程中或确定病毒在体外稳定性的实验中对病毒的检测；第二种，在研究病毒的侵染性克隆变异效应时的病毒诊断和检测；第三种，根据以往的实验预测到某种作物中存在一种或多种已知病毒时，在作物的整个生长季对病毒进行检测和鉴定，并评价其存在的普遍性；第四种，在特定的一种作物上或一个地区内分离到一种新的病毒，确定它是否是一种新的病毒还是一种已知病毒的变种或株系，或是和已知病毒一致；第五种情况是在研究病毒的流行学时，检测和诊断技术都是必需的。过去已出版的有关病毒描述的文献经常是没有足够的数据来区分这些可能的不同情况，所以这些文献仅是对病毒的部分描述，必然是不够的。

有关病毒株系的界定问题将在第17章讨论，描述和划分一个未知病毒的标准已在第2章中列出。在其他章节中也包括一些病毒诊断问题的相关论述：如关于病毒组分的第4章；关于病毒结构的第5章；关于病毒表达和复制的第7章和第8章以及关于引起类似病毒病症状的病原物的第14章。

供试植物材料的选择对于检测、鉴定和诊断能否成功非常重要。病毒在被侵染植株内的分布可能非常不均（第9章），有很多因素影响病毒在植株内的含量，因而影响到检测的难度（第10章）。这些问题对于某些作物尤其重要，如供试材料来源于块茎、球茎和球根的作物及木本的多年生植物。

评价不同方法的相对优点时，以下是一些需要考虑的重要因素：

（1）要解决的问题是什么？仅仅是确定植株是否被病毒侵染，还是要确定是哪种病毒侵染的，或是要确定是哪种病毒的哪个株系侵染的？

（2）灵敏度：多大量的病毒可以被检测到？

（3）准确性和可重复性。

（4）一位操作者在一定时间内可以处理的样品数量。

（5）所需仪器和材料的花费及复杂程度。

（6）所需操作者技能的高低程度。

（7）田间条件的适应性。

后3种因素对于热带的发展中国家可能尤为重要。因此，足够的生物学检测技术在这些国家特别重要（Lana，1981）。

最后，必须要牢记的是田间的病株可能被不只一种病毒侵染，这样，诊断一种未知病害的前期步骤必须是确定这种病害是否和一种以上的病毒有关。

按照病毒鉴定、检测和诊断方法所依据的病毒特性的不同，可以将这些方法分为四类：依据生物学特性的方法、依据病毒粒体物理特性的方法、依据病毒蛋白特性的方法和依据病毒核酸特性的方法。

第Ⅱ节　依据病毒生物学特性的方法

病毒分析、检测和诊断的生物学方法比目前可采用的其他方法需要的时间更长，但这些方法仍很重要。只有进行侵染性测定，才能估计出有活性的病毒粒体的相对含量。对于病毒病的诊断，多数情况是只有将病毒接种到适当的寄主植物上，才能确定某一特定病毒分离物能引起严重的病害还是轻微的病害。然而，这些生物学方法的确有一个主要的缺点，尤其用于一种新病毒的鉴定或者是病毒的检疫，即使在最严格的条件下，被侵染的植株也可能会成为当地作物的初侵染源。Hill（1984）、Walkey（1991）、Matthews（1993）及Dijkstra和de Jager（1998）的文章中对生物学方法的实际应用方面进行了论述。

A. 侵染性测定

1. 依据局部斑数量的测定

Holmes（1929）认为TMV机械接种到心叶烟（*Nicotiana glutinosa*）叶片上产生的局部坏死斑可用于相对侵染性的测定。这一方法比起先前的估计接种植株群体内被系统侵染的植株数目的方法更准确，使用的植株数量更少。从那时起，开始了很多寻找特定病毒的局部枯斑寄主的工作。有关机械性传播各方面的问题已在第12章中论述。

只要能产生清晰的局部坏死斑或局部环斑的寄主就可用于局部斑测定［彩色图版3.1(A)，(B)和彩色图版3.2及3.3］。有些病毒能产生可重复的褪绿斑，但有些病毒产生的褪绿斑是从清晰的斑点向微黄色部分逐渐变化的。对于这样的植株，有时可以利用斑点内细胞和未侵染细胞中淀粉含量不同的这一特征进行判定。在光合作用一段时间后，病毒侵染的细胞中淀粉含量较低；经一段黑暗时间后，病毒侵染的细胞中淀粉含量较高。方法是将叶片在乙醇中脱色后，用碘染色。要获得满意的可重复的结果，环境条件和取样时间需严格控制。有些寄主-病毒组合也利用热处理叶片产生的局部坏死斑进行测定（Foster and Ross，1975）。

植株的营养状况可能影响到局部斑的清晰度，如中国大白菜在氮素缺乏时，TYMV侵染后产生清晰的紫色局部斑（Diener and Jenifer，1964）。

恰当的、精细的局部斑实验设计可区分两个病毒样品间小到10％～20％的侵染性

差异。但是，有些文献列出的局部斑实验的例子毫无意义，由此得出的结论是没有根据的。值得注意的 4 个主要问题是：①标准接种物接种在不同的叶片上产生的局部斑数目变化也很大；②局部斑数目对接种物稀释度曲线的总的特征；③多组分病毒的碰撞动力学（hit kinetics）；④有效比较的统计需要。

a. 叶片间差异

影响寄主植物感病性的环境和生理因素已在第 12 章中论述。这些因素包括植株年龄、病毒在寄主中的遗传变异、叶位、植株营养条件、水分、温度、光强、季节和一天内的不同时辰。Samuel 和 Bald（1993）认为同一叶片的左右两半叶的差异比不同叶片间的差异要小得多。此后，大多数局部斑鉴定实验的设计是使用半叶法。对于某些植物如菜豆（*Phaseolus vulgaris*），有两个相互对称的初生叶，位于植株的同一位置上，因此就有 4 个相对一致的半叶可以利用。如果接种时注意操作过程和已接种叶片放置的条件，可提高局部斑测定实验的灵敏度和可重复性（McKlusky and Stobbs，1985）。

半叶法实验中需要的叶片数目依赖于实验所要求的准确性、鉴别植株的一致性和需要比较的样品数目。如果鉴别植株生长在高度标准化条件下，根据已有的经验可以去除个别表现与群体内其他个体差异显著的植株。如果一次比较两个样品，至少需要 6～8 片叶；大于两个样品时，可有多种设计方法。一种简单但需要鉴别植株较多的设计方法是在叶片的一半接种相同的标准对照，另一半接种不同的待测样品。

比较恰当、有效的是使用拉丁方设计。例如，每株心叶烟（*N. glutinosa*）上有 4～8 片叶可供利用，如果比较的样品数目较少，可以在所有植株的同一位置叶片上接种一种样品；如果比较的样品数多于叶片数，在植株的同一叶位上安排的每种样品的数目和实验设计的重复数应是相同的。Kleczkowski(1950)、Fry 和 Taylor(1954)以及 Preece（1967）设计了一些更为复杂的实验方案。但有必要限定局部斑测定实验的规模和复杂性。规模较大的实验，接种和标记过程中出现错误的可能性就大；由于接种时间长，植株在一天内不同时辰感病性的变化可能会影响到实验结果，除非考虑到了这一因素而设计出更复杂的实验。

b. 接种物稀释度和局部斑数目的关系

Best（1937b）研究了 TMV 接种物稀释度与心叶烟（*N. glutinosa*）上局部斑数目的关系。他发现浓度-局部斑数目曲线可以分为 3 部分：①高浓度病毒部分：随浓度的变化局部斑数目的变化很小；②曲线的中间部分：浓度的变化与局部斑数目变化大致相对应；③低浓度病毒部分：浓度的变化对局部斑数目的变化影响很小。很多病

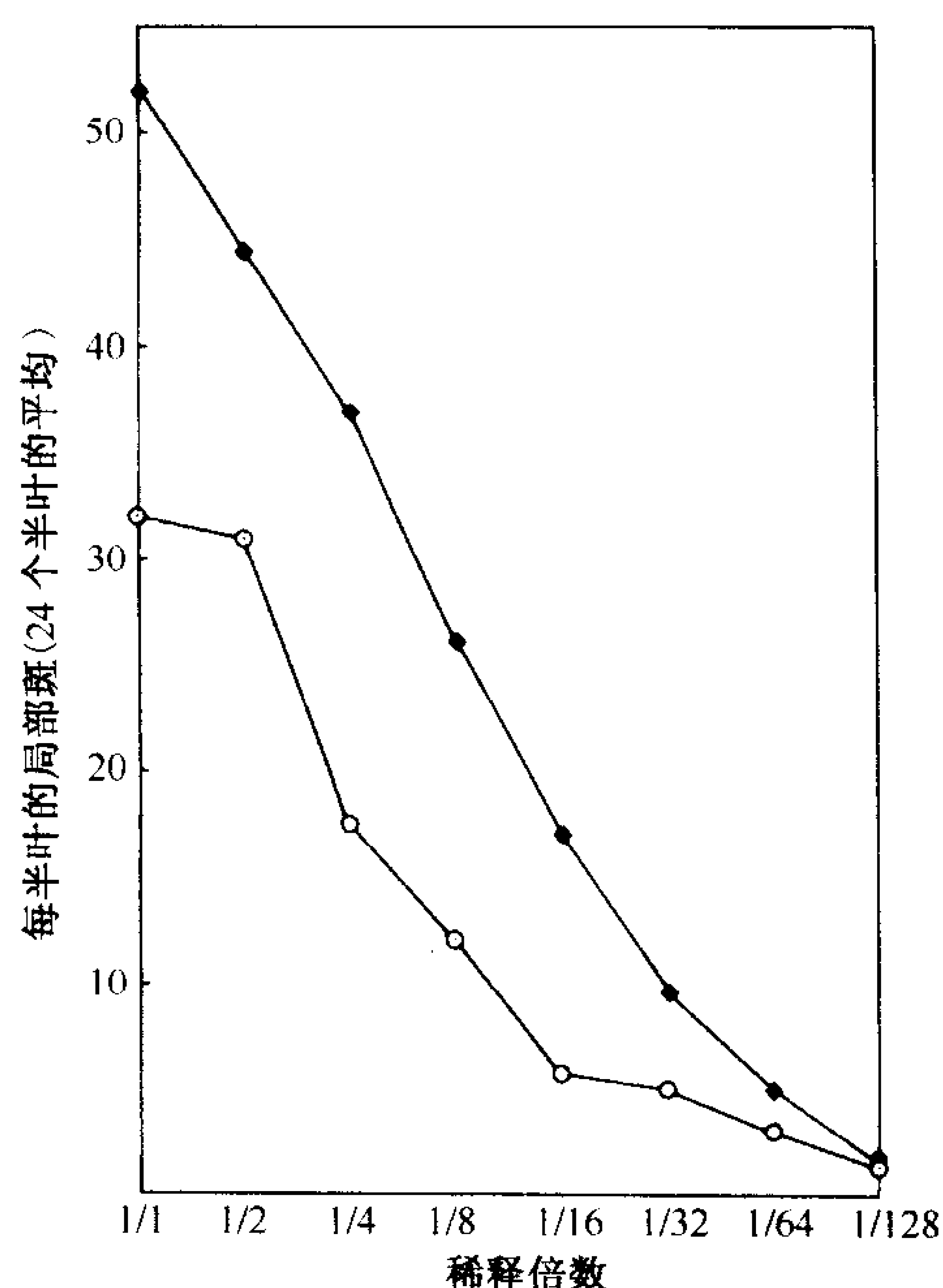


图 15.1 侵染性稀释曲线。接种物稀释对两种植物病毒接种产生的局部斑数目的作用。◆ 心叶烟中的 TBSV；⊙ 心叶烟中的 TMV。承蒙惠允，数据引自 Kleczkowski（1950）。

毒但不是所有病毒都表现这一特征，图 15.1 表示了两个稀释曲线。

无论是从理论角度还是从实践角度上看，病毒稀释曲线都是很有意义的。第 12 章中指出侵染性和侵染过程相关。从实践角度看，稀释曲线的形式有几种含义：第一，局部斑的数目很大或很小时，两个样品的比较是没有意义的，其误差可达几个数量级；第二，只有局部斑数目和稀释度大体成比例时，样品间的比较才有效；第三，稀释曲线的斜率是变化的，不能根据一个实验推导另一个实验结果，这意味着两个样品的比较必须设几个不同稀释度（通常为 2×、5×或 10×）。总的来说，和心叶烟叶片大小差不多的叶片，如果每半叶的局部斑数目在 10～100 个范围内，根据其平均值进行估计是有效的；比心叶烟叶片大得多或小得多的叶片，局部斑数目的范围是不同的。

可能影响稀释曲线斜率的因素包括：①接种物中存在的抑制剂的稀释可能会降低曲线斜率；②成聚集状态的病毒在稀释过程中的解离也会降低曲线斜率；③已发现有几种病毒需要两个或两个以上病毒粒体才有侵染性（图 15.2），这样会提高曲线的倾斜度（Fulton，1962）；④接种时间内鉴定植株感病性的改变对曲线斜率的影响取决于接种的次序和一天内的不同时间，降低或增加曲线斜率。

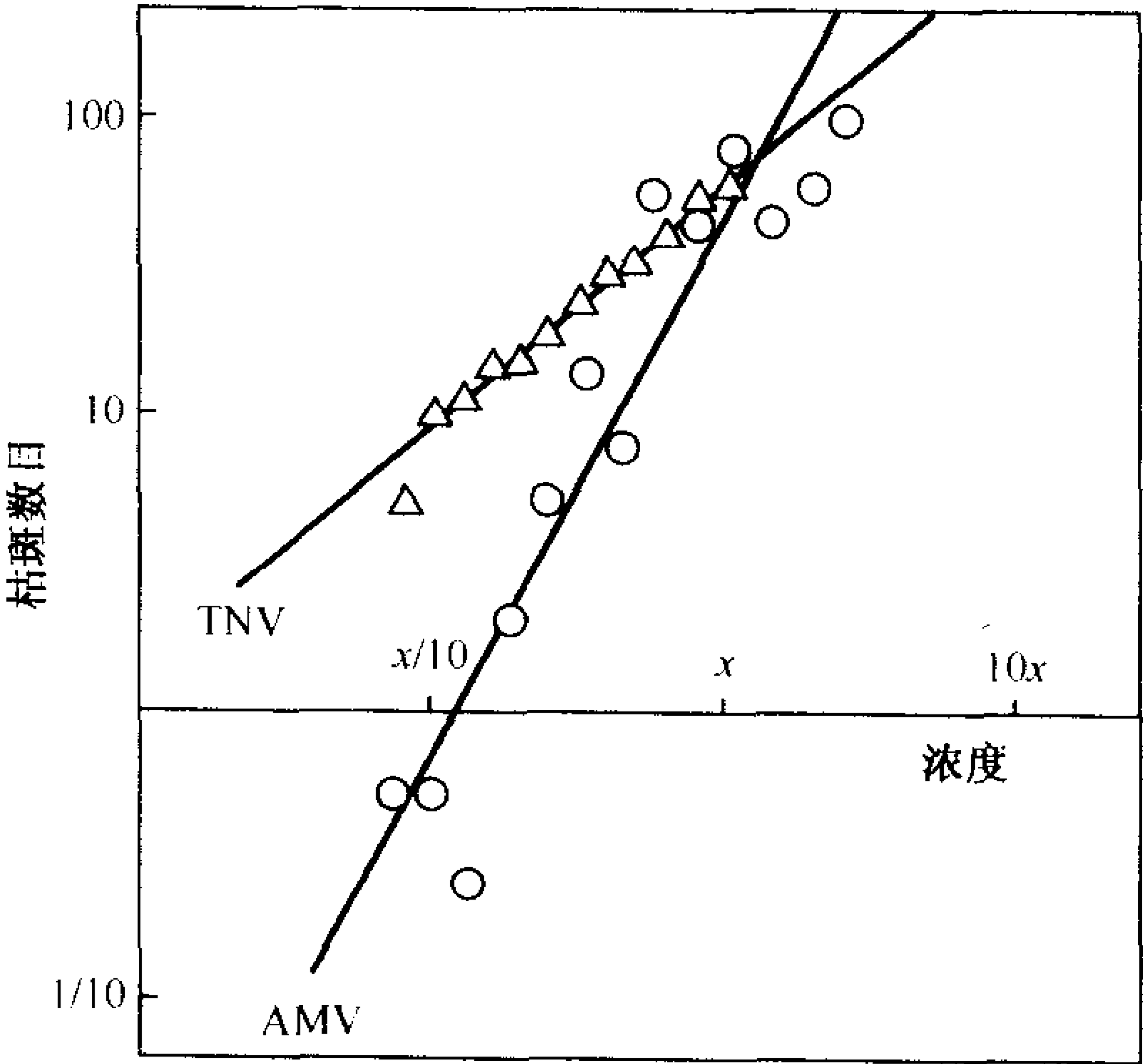


图 15.2　单分体病毒（TNV）和多分体病毒（AMV）的稀释曲线的比较。两种病毒的寄主均为菜豆（*Phaseolus vulgaris*），对于 TNV，x=0.15 μg/ml；对于 AMV，x=9 μg/ml。承蒙惠允，引自 van Vloten-Doting 等（1968）。

c. 局部斑数目与侵染性病毒浓度的关系

尽管已考虑到叶片间的差异（可以通过重复和不同的实验设计方案消除）和实际病斑数目在稀释曲线中间部分降低的事实，局部斑数目仍不能直接转换为相对的侵染性病毒含量。解决这一问题的最简单且实用的方法是设计合适的稀释度（在预备实验结果的基础上），使得稀释度之一的处理产生的局部斑数目与对照的标样产生的数目大致相等，且其数目在有效范围之内，即每个叶片或每半个叶片上有 10～100 个病斑。

正确地使用局部斑实验数据需要进行统计分析。Kleczkowski（1949，1953）注意到统计分析时采用枯斑数目及其对数值（此前的研究者使用的一种转换方式）都不太合

适。局部斑数目平均值的变异系数随着平均值的增加而增加，不是正态分布。Kleczkowski 推导出一种适用于在局部斑数目平均值大于 10 的情况下的转换方式，其公式为：

$$y=\log_{10}(X+C)$$

式中，X 指局部斑数目；C 为常数，每个实验的 C 值可经估计得出，但取 5～20 间的任何值都可得到满意的结果。

d. 小结

在设计和应用某种检测体系时，都应当充分考虑到有许多因素会影响病毒的侵染性和寄主植物的感病性。研究某个处理对某个样品侵染性的影响时，需考虑到这种处理是否会以某种形式（如 pH 或螯合剂）改变介质的状态，间接影响到病毒的侵染性，而不是处理本身对病毒的直接影响，这一点很重要。

检测实验的规模和复杂程度应和整个实验的需要相适应。如果非常接近的侵染性估计就能够满足需要，再设计一个更为精细、随机的实验是没有必要的。通常更容易出错的情况是，从设计和分析不充分的实验中得出结论。在这点上，经常被忽视的一个因素是一天内的不同时间对鉴别植株感病性的影响（第 9 章第Ⅲ节 A. 3 部分），其影响程度变化很大，如果在 1 个小时左右就能完成处理步骤，可以忽略这一影响；对于复杂的实验设计、大量的待测样品或为了使实验结果更准确而使用大量的鉴别植株时，这一因素会在整个体系上影响到实验结果。

Dijkstra 和 de Jager（1998）提出了有关局部斑测定实验应用方面的建议。

e. 昆虫介体单层细胞内病毒的检测（Uyeda *et al.*，1995）

L. M. Black 及其同事建立了检测 PYDV 和 WTV 的一种方法。这种方法是使病毒生长在盖玻片上的昆虫介体细胞单分子层中，其原理与检测细菌和脊椎动物病毒的噬菌体斑的方法相同。与此相应的关于 PYDV 的研究是：Hsu 和 Black（1973）发现以单分子层或叶表皮的单位面积的细胞数目为基础，利用昆虫介体细胞的检测方法比用黄花烟（*Nicotiana rustica*）局部斑检测方法的灵敏度高出 $10^{3.7}$ 倍，而且使用介体细胞的检测方法比使用叶片的变异性更小。Kimura（1986）研究了通过计数介体细胞单分子层上病斑数目的方法测定 RDV 侵染性的条件。这一方法比介体注射方法灵敏度高出 100 倍。Omura 等（1988）应用细胞单分子层的方法也检测了 RGDV。

2. 依据被侵染植株数目的群体量化法（quantal assay）

在 Holmes（1929）提出局部斑检测方法之前，测定侵染性的唯一方法是将不同稀释度的样品接种到多个植株上，然后记录被系统侵染的植株数目。这种方法非常费时，而且要得到可靠的结果所需的植株数目很大。但有时又不得不利用这一方法。例如，有些病毒没有合适的局部斑寄主或者只能通过昆虫介体传播。Brakke（1970）对群体测定的统计学方面的问题进行了论述。

a. 整株植物的机械接种

群体测定法是将待接种物经系列稀释后（必须包括只有一部分植株被侵染的稀释度）接种到一植株群体上，最后记录系统症状的有无。这种方法之所以被称为群体测定，是与利用局部斑数量的定量方法（quantitative assay）相区别的。群体测定法的准

确性可通过很多措施得到提高。如果能够栽培大量的鉴别植株，并且接种较容易，利用这种方法能得出有益的数据（图 15.3），利用这些数据就可以估算出病毒的稀释中浓度（LD_{50}）并能得出实验准确性的统计估计。

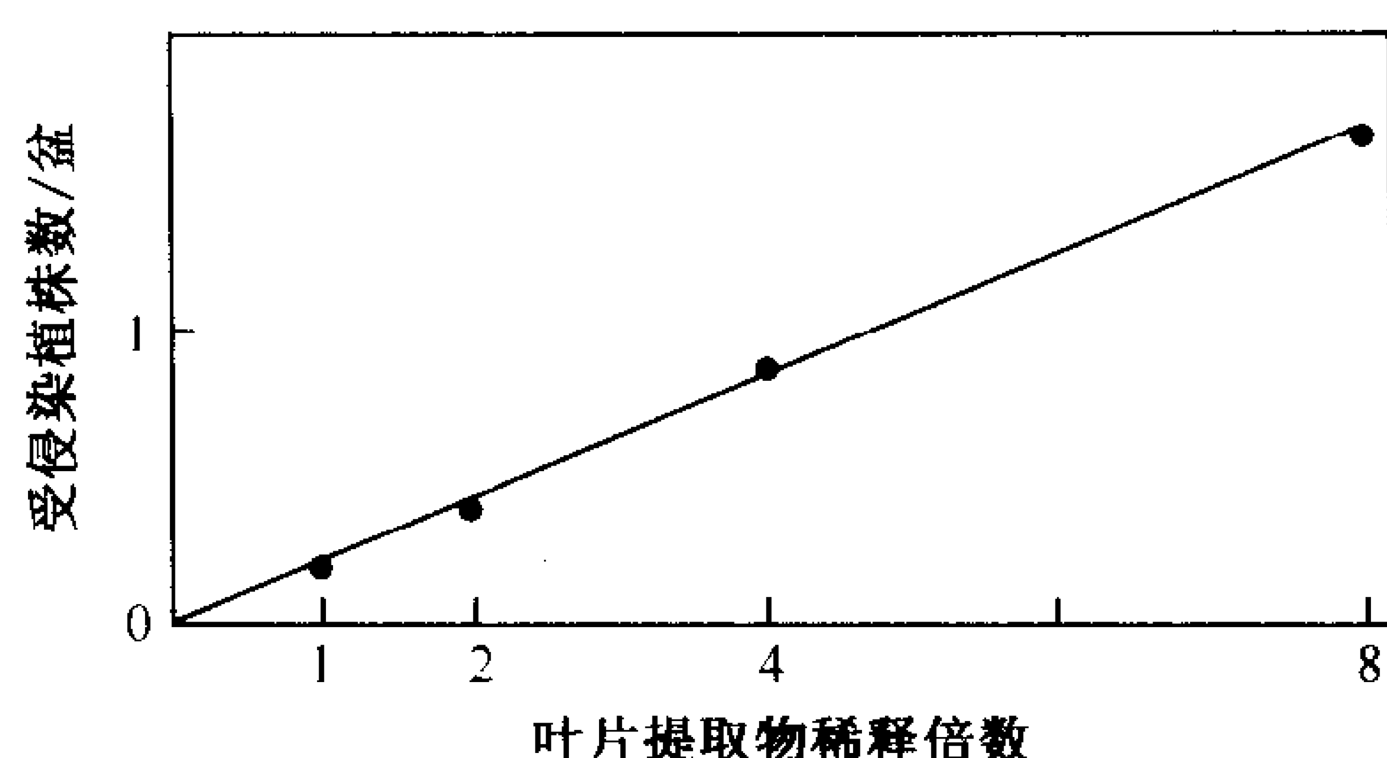


图 15.3　定量分析。使用大量的植株以获得侵染性病毒的精确测定。制备 4 个 SCMV 侵染的高粱叶片的粗提液稀释度，每一稀释度接种 525 株高粱幼苗（每盆 25 株）。重复实验 7 次，因此，图上的每一点是基于 147 盆的结果。1∶1/160 000；2∶1/80 000；4∶1/40 000；8∶1/20 000。由于直线穿过原点，因此可以判定 SCMV 可能具有单分体基因组。承蒙版权所有者（© The American Phytopathological Society）惠允，引自 Dean (1979)。

接种病毒量低的植株比接种量高的植株产生系统症状的时间长。把系统症状出现所需的时间和系统性感病植株的比例结合起来，利用数学方法处理，可能会使群体测定法的准确性增加（Diener and Hadidi，1977）。

b. 培养组织块样品

有时可以取很多小的不含病毒或病毒含量很低的组织块用来估计病毒从植株的一部分向另一部分运动的速率。将组织块单独培养，使所含的病毒复制增殖达到可检测的量，再通过侵染性测定或其他鉴定方法确定病毒的有无。Fry 和 Matthews（1963）应用这种方法测定了烟草叶片接种 DMV 后，表皮下面的细胞受侵染所需要的时间。

c. 昆虫介体

不能通过机械接种但能通过昆虫介体传播的病毒，可用昆虫介体的有效传播率估计病毒的相对含量。使介体带毒的方法包括在病株或含病毒溶液的膜上饲喂昆虫或用含病毒的溶液注射昆虫。

通过在被侵染组织上饲喂昆虫介体的方法得出的结果也可能反映了昆虫携带病毒的差异，而不是组织或器官中病毒含量的不同。这些方法都很费力且涉及昆虫介体和寄主植物的生物学差异。例如，介体在鉴别植株上饲喂时间的长短可能会影响结果；介体也可能在鉴别植株上取食的过程中死亡。如果在一株鉴别植株上使用多头昆虫介体，就需要更多精细的统计分析。由于存在以上问题，这些方法没有得到广泛的应用，但以往的这类实验也提供了一些关于 WTV 等病毒的可利用的资料（Whitcomb and Black，1961）。

B. 用于诊断的指示植物

通常只根据田间植株上的病害症状难以进行正确地鉴别，尤其在几种病毒产生的症状相似时，如甜菜上的黄化病（Duffus，1973），或一种病毒如 CMV 引起的症状有很大的变化（Francki and Hatta，1980），或在单一寄主上存在以上两种情况（Francki *et al.*，1980a）。因此，在植物病毒学发展的早期，人们就开始针对所研究的一种或多种病毒寻找能够表现出一致的，清晰的且有特征性的症状（通常在温室条件下）的合适的寄主植物种或品种。这些指示植物为常规诊断提供了最基本的手段之一。烟草属（*Nicotiana*）、茄属（*Solanum*）、藜属（*Chenopodium*）、黄瓜属（*Cucumus*）、菜豆属（*Phaseolus*）、蚕豆属（*Vicia*）和芸薹属（*Brassica*）中已发现有许多好的指示植物。有些植物如苋色藜（*Chenopodium amaranticolor*）、昆诺藜（*C. quinoa*）和本生烟（*Nicotiana benthamiana*）能和很多病毒相互作用。Horvath（1993）综述了有关植物病毒诊断的指示植物。有时改变植株生长条件，就可使其适用于病毒诊断（Lee and Singh，1972）。

近年来，对病毒的结构与复制的认识不断深入，植物病毒分类已发展到可以将已知病毒归类到科或属的阶段。但仍需继续寻找更好的、改进的指示植物。例如，Schmidt 和 Zobvwalski（1984）调查了 33 个法国菜豆品种和品系分离鉴别 PYMV 不同株系的能力；Van Dijk 等（1987）筛选了烟草属大约 200 个种及其近缘种，发现了几个新的有用的指示植物。应用生物学家协会出版的植物病毒志（AAB/DPV）列出了各种病毒可利用的指示植物种类（参见附录 3）。

比较不同实验室利用指示植物进行病毒诊断的结果时，应考虑到同样命名的一个品种的不同品系对某种病毒侵染所表现的症状可能会变化很大（van der Want *et al.*，1975）。

使用指示植物测定多种样品时，需要占用温室几周或更长时间，但是每种样品机械接种的实际操作过程比许多其他方法所需的时间要少。已有很多提高汁液提取和接种的效率的尝试（Laidlaw，1986）。如上面提到过的，还需注意将已接种的鉴别植株放置在适当的容器内，减少病毒逃逸到环境中去的可能。

对于有些病毒病，国际间的合作已确定了特定病害使用一套标准的指示植物。国际园艺科学协会从事果树病毒病的研究人员已列出了诊断 8 个主要木本果树的病毒病和类病毒病的指示植物种类，规定了检测所需的田间或温室的条件。在所列出的 137 种病害中，可单独依靠指示植物进行诊断的有 87 种，其余 50 种已制备了抗血清，可利用 ELISA 检测辅助指示植物的检测方法（Dunez，1983）。

C. 诊断中的寄主范围

早期植物病毒研究工作中，寄主范围被作为诊断的重要标准。目前关于寄主范围的信息仍很重要，甚至在一定条件下很关键，但只有相对很少一部分可能的寄主与病毒互作组合被检测过，除此之外，我们对寄主范围的认识仍很局限或者说必须要认识到以下几个方面：

（1）很多已报道的寄主范围的研究，只记录了可确定为寄主的结果。

（2）对于接种后没有表现症状的植株通常没有再回接到指示植物上，确定是否为隐症侵染。这种侵染情况可能并不少见。Horvath（1983）在检测 456 种植物对 24 种病毒的敏感性时发现有 1312 个新的可疑的寄主-病毒互作关系，其中 13%是潜隐性侵染。接种时因叶片上有残留的接种物，所以回接时不得不主观判定哪些局部斑是由植株内部的病毒复制增殖而引起的。Holmes（1946）认为回接到心叶烟（*N. glutinosa*）上时，每片叶能产生 10 个枯斑就表明 TMV 或 TEV 在测试寄主范围的植物上能够增殖。目前的检测手段不太可能检测到只在侵染点附近的一个或几个细胞内增殖的病毒。利用侵染性 RNA 接种能降低或排除由于残留接种物造成的侵染性背景。

（3）接种方式也可能影响测定结果。由于机械接种很方便，已广泛用于寄主范围的研究中，但许多植物含有侵染抑制剂，能抑制病毒接种到这种植物上，或从这种植物接种到其他植物上，也可能同时存在上述两种情况。

（4）对于供试植物种类数量很大的研究，通常将各种植物处于同一生长条件下是很方便的，但已知某一特定植物种类对一种病毒的敏感性随生长条件的不同而变化很大（参见第 12 章第Ⅱ节 B. 2 部分）。

（5）关系很近的病毒株系的寄主范围也可能不同，关于寄主范围的数据仅能用于被研究的病毒株系。

（6）完整叶片不能或很少能被某种病毒侵染，但叶肉细胞的原生质体可能更容易被侵染（Huber *et al.*，1977）（表 10.1）。

尽管存在这些问题，寻找能够区分特定作物种类上的某些病毒的寄主植物和非寄主植物还是值得的。例如，一个针对引起豆科植物病害的蚜虫持久性传播病毒的国际间研究项目确定了 12 种豆科的和非豆科的能够区分研究中的 8 种病毒的鉴别植物（Johnstone *et al.*，1986）。

有时寄主范围比其他测定更能区分不同的病毒，例如，苏格兰种植的树莓就是利用对 RBDV 普通株系有抗性的品种来预防 RBDV 引起的病害，而用血清学方法和指示植物法都不能区分打破抗性的病毒株系和普通株系（Murant *et al.*，1986）。不同病毒的寄主范围在分类上的广度变化很大。对于那些只能侵染相对较小范围内的植物种类的病毒，可有效地利用寄主范围进行诊断。因为存在基因对基因的抗性（参见第 16 章第Ⅴ节 B. 1 部分），植物的特殊的基因型也可用于鉴别一种病毒的不同株系。

D. 与症状相关的方法

病毒侵染经常影响到植物体内叶绿素的水平。Daley（1995）指出叶绿素的荧光分析可在田间用于研究植物病毒的侵染情况，这种方法可长期使用，而且没有破坏性。也许病毒侵染检测的遥感系统可利用这一方法，但用于病毒鉴别的潜力可能不大。

如第 10 章第Ⅲ节 K 部分所述，一些病毒与寄主相互作用时产生水杨酸（SA），SA 导致代谢热的产生，被 TMV 侵染的烟草叶片在症状表现之前可用自动温度记录仪检测到产生的代谢热（Chaerle *et al.*，1999）。

E. 用于诊断的传播方式

第 11 章和第 12 章论述了病毒传播的不同方式，通常这些传播方式可在特定的情况

下作为病毒诊断的标准。例如，能通过种子和线虫传播的正二十面体病毒粒体可能为线虫传多面体病毒属（*Nepovirus*）的病毒。在另一种情况下，能机械传播和桃蚜（*Myzus persicae*）传播的病毒可能为几个特定病毒属中的其中一种。

F. 用于诊断的细胞学反应

第 3 章论述了侵染的细胞学反应，这些反应已被用于病毒的辅助诊断。通过光学显微镜观测到的细胞学变化有时可有效地补充宏观症状而用于病害诊断。Christie 和 Edwardson（1986）图示了病毒侵染引起的内含体的分类并讨论了相关问题。Edwardson 等（1993）综述了这一方法在诊断上的应用。如果内含体足够大，就可利用光学显微镜观察。应用光学显微镜有很多优点：①光学显微镜是常用的仪器；②样品制备技术简单，如通过观察红三叶草的条状表皮内的内含体可辅助一些病毒病的快速诊断（Khan and Maxwell，1977）；③视野较大，容易检测多个细胞；④有多种可利用的细胞化学的方法。

但有些类型内含体的观察需用到超薄切片的电镜法。Hamilton 等（1981）指出了 9 个属病毒产生的内含体可以作为属的诊断依据。有些病毒在特定寄主植物上产生特征性内含体则可用于病毒种的鉴别，如 CTV 在柑橘树上产生的内含体可作为这一种的鉴别依据（Brlansky，1987）。同一病毒如 CaMV（Shalla *et al.*，1980）的不同株系可能产生不同的细胞学反应；AMV 不同株系的病毒粒体能形成不同的聚集体形式（Hull *et al.*，1970）。

G. 复合侵染

两种或两种以上病毒同时侵染同一植株的现象很常见。对于复合侵染，仅仅根据生物学特性进行诊断是较困难的，尤其当寄主的反应多变时，如加利福尼亚州发生的莴苣内脉坏死病（Zink and Duffus，1972）。但复合侵染的病毒在生物学特性上存在的几种差异可用于这些病毒的分离：①如果某一寄主能将一种病毒限制在接种叶片上而其他病毒在这种寄主上可系统运动；②如果发现一种寄主植物只能被其中一种病毒侵染；③如果两种病毒在同一寄主上引起的局部斑不同；④如果两种病毒的传播方式不同，如传播介体为不同种的无脊椎动物。

有时，田间的一些病害可能是相对稳定的两种或两种以上病毒组合混合侵染的结果。例如，引起豌豆耳突花叶病的两种病毒（Demler *et al.*，1996a）及引起花生丛簇病的两种病毒和一种卫星病毒（Murant，1990；Murant and Kumar，1990）。至少有 3 种病毒被认为是和胡萝卜杂色矮化综合病（Vercruysse *et al.*，2000）及莴苣斑点病（Falk *et al.*，1979）相关。

H. 病毒接种物的保存

在新病毒的辅助诊断和其他病毒学研究过程中，通常保存病毒接种物比在温室内保存毒株更可行，可以节省空间，减少交叉污染或不同病毒株系混杂的可能性。第 4 章（第Ⅱ节 A.7 部分）已论述了纯化病毒的保存方法。

TMV 的许多株系可以在风干的叶片或未经消毒的液体培养基中长期保存。除非在

特殊的条件下，其他多种病毒的接种物都会不同程度的迅速丧失侵染性。多数保存方法涉及组织脱水或液体脱水、添加保护剂、低温保存或以上方法的结合。Hollings 和 Stone（1970）发现所测试的 74 种病毒的大多数都能在有侵染性的叶片汁液冻干后至少存活 1 年。冻干之前加入 D-葡萄糖和蛋白胨，室温保存在安瓿瓶内，有些可保持侵染性十多年。

脱脂奶粉已被用作 LNYV 等一些不稳定病毒的储存保护剂，样品经脱水后储存于 4℃（Grivell *et al.*，1971）。

有些病毒，如 WMV（De Wijs and Suda-Bachmann，1979）以液相接种物的冰冻状态保存效果较好；但对另一些病毒，如 RCMV（Marcinka and Musil，1977）效果可能不好。许多不稳定的病毒以化学脱水的组织块保存于 10℃左右，其活性可达数年之久（McKinney *et al.*，1965）。取自生长旺盛、幼嫩的被侵染植株的叶片组织保存于密封玻璃瓶中，其中的病毒可以保持侵染性的时间最长。但是必须注意到保存的叶片材料只含有一种病毒。例如，1962 年干燥保存的标本为 SCPMV 的叶片材料中还含有 CPMV 和 CCMV，而直到 1964 年才有人首次报道 CCMV（Hull，个人观察）。

在不同国家间空运时，可以将新鲜的叶片材料放在几张干燥的纸中间，装在聚乙烯袋内，封好，放在冰袋里，4℃运输。如果使用潮湿的纸可能会长出真菌腐烂物，尤其是在热带地区采集的叶片。对于一些不经久的材料或没有 4℃保藏条件，可在封入袋中之前先在 50%甘油中浸泡几个小时（Alhubaishi *et al.*，1987）。

第Ⅲ节　依据病毒粒体物理特性的方法

A. 病毒粒体的稳定性和生理生化特性

1. 稳定性的测定

早期，侵染性测定（通常在病毒的抽提液中）得到的病毒稳定性是确定病毒不同属的重要标准，如热钝化、体外保毒期和稀释限点。应用这些标准是由于当时缺少病毒的其他物理特性资料，但是这些数据变化太大已不能作为鉴别病毒或将病毒分成不同属的准确依据。遗憾的是，有时还不得不利用这些数据进行鉴别（Francki，1980）。仅仅对病毒的生物学特性和在抽提液中的稳定性进行描述的资料通常只是文献的堆积，但有时从多种解离病毒的试剂的比较中能够得出一些有用信息。例如，高盐能解离主要通过离子键结合在一起的病毒亚基，而它们的稳定主要通过疏水力的结合；尿素能解离后一种类型的病毒。这些信息可用于病毒提纯程序的设计。

2. 生化特性

每种病毒由于其粒体细微的组成和结构不同，而具有某些区别于其他病毒的可测得的特性。这些特性可用于病毒鉴定或作为确定病毒间相互关系的标准。下面论述了一些经常测定的特性。

密度。通常密度的测定是在水、蔗糖溶液或氯化铯溶液中进行的（参见第 4 章第Ⅱ节 A. 5 部分）。没有包膜的病毒，其密度主要反映了病毒的核酸比例。在氯化铯溶液中

测定病毒密度时，不同的缓冲液可能对结果有影响（Scotti，1985）。

沉降系数和扩散系数。这些特性反映了病毒粒体的质量、密度和形状，第 5 章已对此进行了较深入的论述（第Ⅱ节 B.1 部分）。

紫外吸收光谱。一种病毒的紫外吸收光谱是这种病毒核酸和外壳蛋白的吸收光谱的综合结果［图 15.4（A）］。核酸在约 260 nm 波长处有最大吸收峰，约 230 nm 处为吸收谷；而蛋白质的最大吸收峰在约 280 nm 波长处，吸收谷在 250 nm 处。核酸的比吸收值（specific absorption）［20～25 *OD*/（mg·ml），260 nm］比蛋白质的［约 1 *OD*/（mg·ml），280 nm］高得多。两者综合后得到的病毒的吸收光谱在 260 nm 处为吸收峰，230～240 nm处为吸收谷［图 15.4(A)，(B)］。

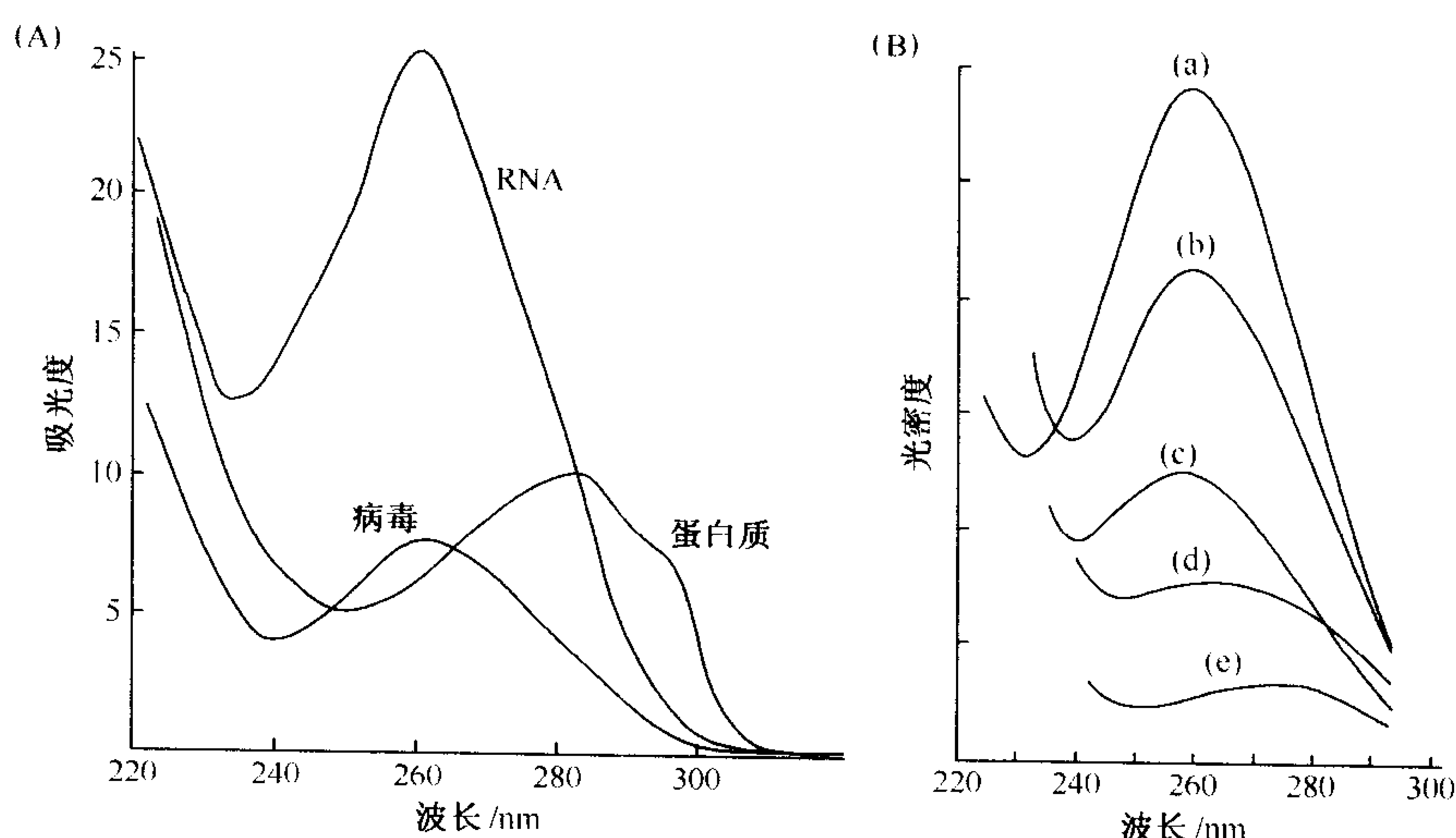


图 15.4　紫外吸收光谱。(A) RNA、含 20%RNA 的一种病毒和典型蛋白质三者的吸收光谱的比较。RNA 和病毒浓度为 1 mg/ml，蛋白质浓度为 10 mg/ml。注意：蛋白质吸收光谱曲线在290 nm 处的肩部是由色氨酸的吸收引起的。引自 Hull（1985）。(B) 各种粒子的悬浮液的吸收光谱比较。(a) TYMV RNA；(b) TYMV 核蛋白粒子（33%RNA）；(c) CMV 粒子（19%RNA）；(d) TMV 粒子（5% RNA）；(e) TYMV 蛋白颗粒（上部组分）。除了（a）以外，所有悬浮液都含有相同重量的物质，(a) 含有物质的量为其他的一半。承蒙惠允，引自 Gibbs 和 Harrison（1976）。

病毒的这种特性主要取决于病毒粒体中核酸与蛋白质的比值。蛋白质的氨基酸组成也会影响到吸收光谱。一些不相关的病毒具有相似的外壳蛋白氨基酸组成，因而具有相似的吸收光谱。如果能够排除非病毒的核酸或蛋白质，尤其是核糖体污染的可能性，紫外吸收特性对于纯化的病毒制剂的鉴定非常有用。由于杆状病毒在不同纯化制备物中其聚集程度变化很大，能使某种病毒浓度的散射光量发生改变，因此，260 nm 下的测定值对于杆状病毒的鉴别可能是不可靠的。

电泳。目前，测定病毒的电泳迁移率通常是在聚丙烯酰胺凝胶中进行的。这一特性是由病毒粒体的大小和表面的净电荷决定的。通常同种病毒的不同株系的电泳迁移率非常相似，可以通过迁移率区分同属内的不同病毒，如 Hanada（1984）报道了黄瓜花叶病毒属中不同病毒的区分；Hull（1977b）报道了 PEMV 的区分。

B. 超速离心

1. 分析超速离心

植物病毒的大小范围正适合于使用分析型超速离心机分析。这一技术可用于跟踪病毒纯化过程、研究不同处理对病毒物理状态的影响及分析粗提纯样品中的病毒含量。使用折射光照相法，通常可以测到病毒浓度为 100 μg/ml 的样品，浓度低至 50 μg/ml 有时也可测到。使用分析型离心机进行病毒分析，除了能够测定现有材料中的病毒含量，其最大的优点之一是能够提供病毒粒体本身的物理鉴定标准，即沉降系数（sedimentation coefficient）。

在研究病毒纯化制剂的以下几方面时，分析型离心方法也非常有用：①存在类似病毒但沉降特性不同的微粒时；②存在其他病毒时；③存在寄主大分子时；④存在病毒聚集体时。虽然这一技术在 1970 年和 1980 年代被广泛应用，但目前应用的较少，即便如此，这一技术仍然是一种很有利用价值的手段。

2. 密度梯度离心

Brakke（1951，1960）发明了密度梯度离心技术，可以用于植物病毒的分离和分析。由于这一技术具有多种用途，已被广泛地用于病毒学和分子生物学领域。其特征是将离心管充满从底部到顶部密度逐渐降低的一种溶液。对于植物病毒，通常使用的是蔗糖浓度梯度溶液，病毒液铺于浓度梯度顶层。使用铯盐溶液时，可以在离心前将病毒粒体溶液与铯盐溶液混合，也可将其置于密度梯度的顶层。

Brakke（1960）将密度梯度的应用分为 3 种情形：

等密度梯度（isopycnic gradient）离心。是指持续进行离心直到梯度中的粒体到达与其密度相同的介质层内。这一类型的梯度离心依据不同粒体的不同密度进行分离。对于很多病毒，单独应用蔗糖溶液不足以形成足够的等密度梯度带。

速率区带沉降（rate zonal sedimentation）梯度离心。在离心前，病毒液置于预先制备好的浓度梯度之上，通过离心，由于不同粒体的大小、形状和密度不同，形成不同的沉降速率，不同速率的每种粒体形成一个区带。在粒体沉降过程中未达到等密度梯度时就停止离心。

平衡区带沉降梯度（equilibrium zonal sedimentation）离心。和速率区带沉降梯度离心相似，差别在于这一类型的沉降不断进行直到大多数粒体到达适当的等密度位置。这一方法中密度梯度的作用是防止对流并将不同种类的粒体局限于某一区带内。密度梯度离心的理论很复杂，但应用很简单、有效。在植物病毒学的研究中被广泛应用。

这一技术需要有高速制备型离心机和适当的水平转头或角转头。离心后，由于光散射的不同，可以看到病毒所在的区带。检测前先用某种适当的方法将离心管内容物取出，可在管底部穿孔，使内容物滴到一系列试管中。有商品化的从上面转移出蔗糖密度梯度离心管的内容物的装置，可测定和记录液柱的紫外吸收值，并能按照需要收集不同组分。图 4.2 表示了这一方法的灵敏度。由于能够收集到一系列的组分，可以使用不同的方法（如侵染性测定、紫外吸收光谱和电镜观察）测定病毒、非侵染性的类似病毒的

组分和寄主成分。如果使用的方法适当，沉降速率差异非常小的组分也可检测到(Matthews and Witz，1985)。

如果已知混合物内一些组分的沉降系数，使用速率区带沉降法可以估计其他组分的沉降系数的近似值。如果有抗血清，可使用血清学方法检测不同组分，或者在密度梯度离心前将抗血清和病毒样品混合，这样沉降系数改变的组分就是能和抗血清反应的成分。

C. 电镜的应用

1. 单位体积内病毒粒体的数目

把一滴合适浓度的病毒溶液与适量的负染剂，如磷钨酸或醋酸铀混合，取少量于电镜铜网上，观测病毒的特征粒体。这种方法很粗略，但能较快速地测定制品中病毒粒体的相对数量。但应特别注意的是一些病毒的粒体，尤其那些靠离子键稳定的病毒在磷钨酸中是不稳定的。使用电镜准确地估计病毒粒体的数量要求已知得测溶液的体积并能数出这一体积内所有的病毒粒体。Williams (1950) 描述了一种方法，先将病毒样品用挥发性盐溶液进行稀释（如醋酸铵或碳酸铵溶液），再将其与含有已知重量、颗粒均一的聚苯乙烯乳胶粒体的溶液相混合，然后用喷雾器将混合物喷到电镜铜网上。液滴照片中聚苯乙烯乳胶粒体的数目可以数出，根据这一数目估计液滴的大小，数出此液滴内病毒特征粒体的数目。不同液滴内病毒粒体数目和乳胶粒体数目的比例有所变化，数出一定数量的液滴内各种粒体的数目可进行可靠的估计，但需应用适当的统计分析方法 (Williams and Taylor，1958)。这一方法很费力，但对某些测定得出的结果可能很有价值。

2. 病毒鉴定

病毒粒体的大小、形状和表面特征是病毒鉴定的基础。通过电镜可以快速地获得部分此类信息。目前，负染法几乎被普遍地用于病毒抽提液或纯化制剂中病毒粒体的测定。通常使用的负染剂是磷钨酸的钠盐、钼酸铵或醋酸铀，使用哪种盐溶液取决于目标病毒粒体在这些盐溶液中的稳定性。

电镜观测可以确定粒体的近似大小，对于杆状病毒可以测定其粒体的不同长度，因而尤为适用。测得的粒体大小受样品制备及负染过程的影响较大（图 15.5）。测得的受侵染细胞超薄切片的结晶状病毒粒体的直径有时也可能是错误的 (Hatta，1976)。有时测定铜网上线性排列的正二十面体病毒粒体的直径其结果较准确。观察铜网上分散的病毒粒体可推知其表面特征。依据病毒的大小、形态，可将其暂时定位到某一特定的属。但是，对于一些较小的正二十面体病毒，要将其与其他病毒属病毒区别开来，单独依据病毒形态还是不够的 (Hatta and Francki，1984)。针对不同的病毒和寄主植物，优化病毒提取方法和负染方法可得到比较理想的结果。Milne (1984)、Roberts (1986) 和 Milne (1993) 论述了目前关于电镜观测方法方面的细节。

对于许多病毒，利用超薄切片的电镜观察是检测寄主细胞或组织内病毒的一种很好的方法。但是这种方法也有其局限性。有包膜的大病毒，如植物黄症病毒属的病毒和杆

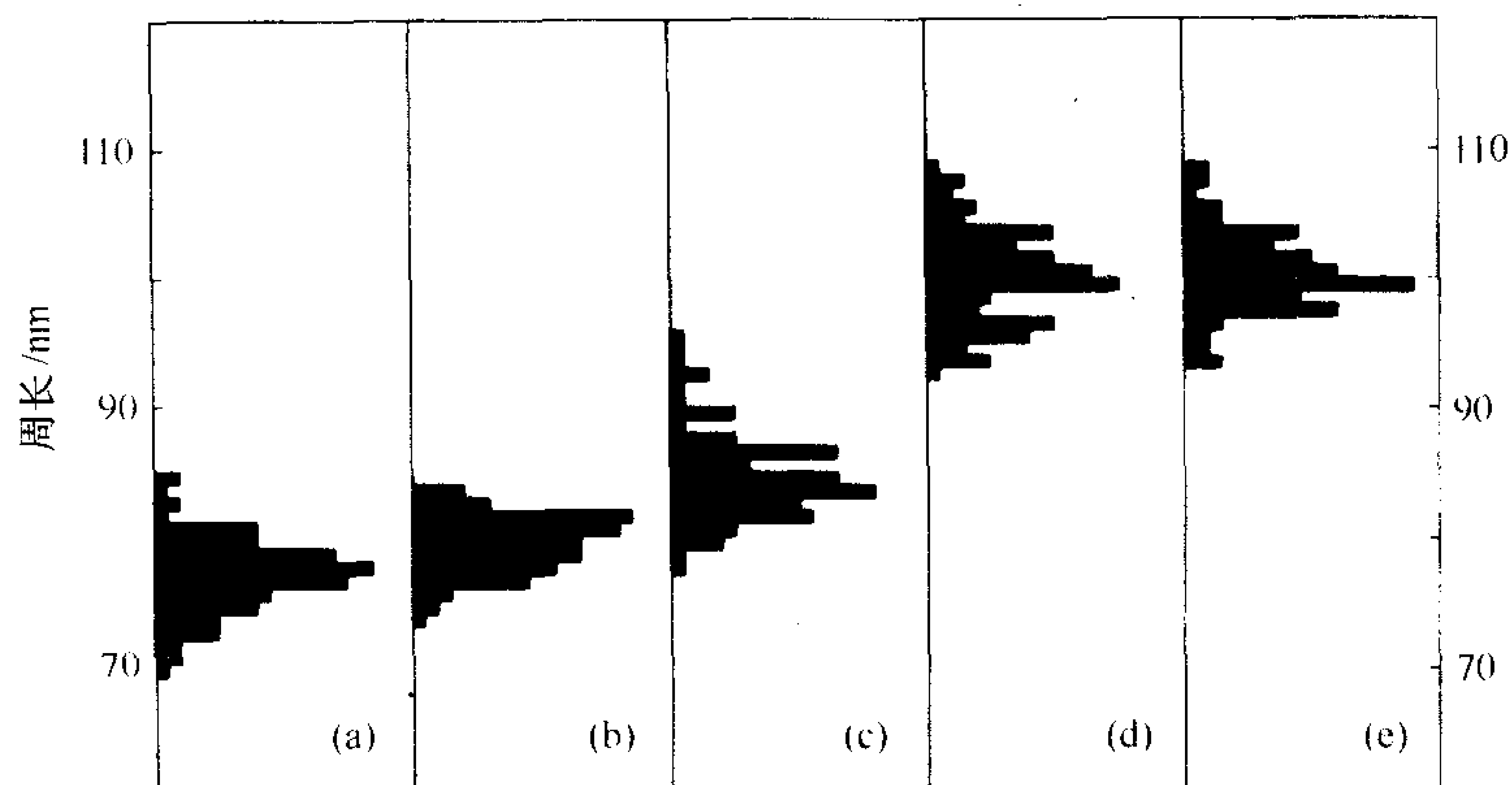


图 15.5 不同处理对正二十面体病毒的表观直径的影响。不同处理下 TRSV 粒子周长（nm）的柱状图：甲酰胺（a）和乙酰胺（b）缓冲液冲洗铜网后再使冻干的病毒粒体附有阴影；使用 2%钼酸胺，pH7.0（c），2%醋酸铀，pH3.5（d）和 2%钨酸甲胺，pH7.0（e）进行负染。只有钼酸胺负染的粒子（c）具有和冻干的粒子相似的大小。承蒙惠允，引自 Roberts（1986）。

状病毒通常比较容易区分，因为在超薄切片中其表形和其他正常的寄主成分表形不同。但是，细胞内病毒的含量和病毒粒体的分布需满足的条件是：如果存在病毒，在细胞的随机切面上观察到的概率应非常大。应当注意，当完全测定直径为 50 nm 的单一细胞内的病毒含量时，必须观察到 1000 个 50 nm 厚的切片。

大多数正二十面体病毒的着色特性和表观直径使得很难区分其分散的单个粒体和细胞质中的核糖体。一些这类病毒能在细胞内形成结晶状排列，据此可将病毒粒体和核糖体区分开。

一些等轴病毒在萎蔫的寄主组织内（Milne，1967；Ushiyama and Matthews，1970）或蔗糖溶液处理而发生细胞质壁分离的失水寄主组织内（Hatta and Matthews，1974）能形成易被识别的细胞内结晶状排列。观察到的病毒粒体结晶状排列的形式与切片平面和铜网的关系有关（Hatta，1976）。

核糖体对核糖核酸酶的消化作用敏感，而小的等轴病毒粒体则不敏感。这一特性已被用于检测细胞内的这类病毒（Hatta and Francki，1981a）。如果没有 80S 核糖体的细胞或细胞器，如细胞核（Esau and Hoefert，1973）、内质网（de Zoeten and Gaard，1969b）、筛管（Esau and Hoefert，1972）和液胞内存在等轴病毒粒体，分散的病毒粒体也可识别出来。但是正常细胞内的细胞核有时也含有结晶状结构，可能也会被误认为是病毒内含体（Lawson *et al.*，1971）。

血清学诊断与电镜应用相结合的鉴定技术将在这一章的后面部分论述。电镜应用与病毒粒体结构的关系在第 5 章中已做了较深入的论述。

D. 纯化病毒的化学分析

如果能够提到足够纯的病毒就可应用化学分析法进行分析。最简单又常被忽略的一种方法是测定一定体积溶液的干物质的重，但这一方法不能区分完整病毒和核酸缺损的

非侵染性粒体。测定干重是测定病毒和其他组分，如核糖或特殊的氨基酸的氮、磷含量的基础。这些组分的测定可用于纯化病毒的分析。含已知重量的纯化病毒的溶液可用于测定每毫升一定重量的这种病毒在 260 nm 波长下的吸收值、确定使用差示折射计进行折射系数测定的因子及从折射光照相中得到的峰或蔗糖梯度中得到的样品的吸收峰的面积向病毒重量转变的因子。这些测定结果可用于此种病毒的其他制备物的分析。

E. 利用放射性同位素测定

1. 体内实验

把磷的同位素 ^{32}P 或 ^{33}P 导入病毒正在增殖的寄主组织内，就可以标记病毒的 RNA。其方法包括：将完整植株的根部浸到同位素溶液内，或将植物组织悬浮于同位素溶液上。同样，^{35}S 标记的硫酸盐可用于标记病毒蛋白。这两种同位素非常便宜，并且标记活性很高。在一定条件下，可以用于检测含量非常低的病毒。在使用原生质体研究病毒复制的实验中，^{35}S 标记的甲硫氨酸用于标记病毒蛋白非常方便。

2. 体外实验

对于容易排除大多数污染物的病毒，如 TMV 和 TYMV，使用放射性标记的病毒是一种灵敏、准确的测定分析方法，可用于多种体外实验。要获得高产量的放射性标记的病毒需在病毒增殖最快的几天内使植株充分吸收同位素。对于完整的植株，实际操作中的 ^{32}P 或 ^{33}P 标记的正磷酸盐（orthophosphate）的量或 ^{35}S 标记的硫酸盐（sulfate）的量最高约为每株 3.7×10^{8} Bq（10 mCi）。在此剂量下，以两种标记的效率约为 5%计算，获得的纯化病毒的标记量约为 1000 cpm/μg。

大多数从被侵染的寄主组织内分离病毒的方法都要损失一些病毒。向分离病毒的起始材料中加入较少的已知量的放射性标记的病毒，通过估算放射性丧失的量可以估计出分离过程中病毒损失的程度（Fraser and Gerwitz，1985）。

第Ⅳ节　基于病毒蛋白质特性的方法

一些最重要的、广泛应用的测定、检测和诊断方法是依据病毒蛋白的表面特性。大多数植物病毒的外壳是由一种蛋白质或多种蛋白质组成的。不同方法依据的病毒蛋白来源不同，包括完整病毒的蛋白质、解离病毒的蛋白质亚基及由细菌克隆的 cDNA 或昆虫细胞体系 DNA 表达的蛋白质。近来病毒编码的非结构蛋白已被用于诊断。

A. 血清学方法

血清学方法是基于病原的一种或多种蛋白质（称为抗原）与脊椎动物针对抗原产生的抗体间的相互作用。Harlow 和 Lane（1988）、Hampton 等（1990）及 van Regenmortel 和 Dubs（1973）综述了免疫反应的理论与血清学的应用。

1. 抗体

通常免疫球蛋白和抗体这两个术语是通用的。但严格地讲，抗体是指能和已知抗原相结合的分子，而免疫球蛋白是指所有能和抗原结合的蛋白质群，不论它所结合的目标蛋白是否已知。抗体由 B 淋巴细胞分泌，是一个很大的糖蛋白家族，具有共同的结构与功能特性。在结构上，抗体是由单个或多个拷贝的呈“Y”形的特征性单元组成（图 15.6）。

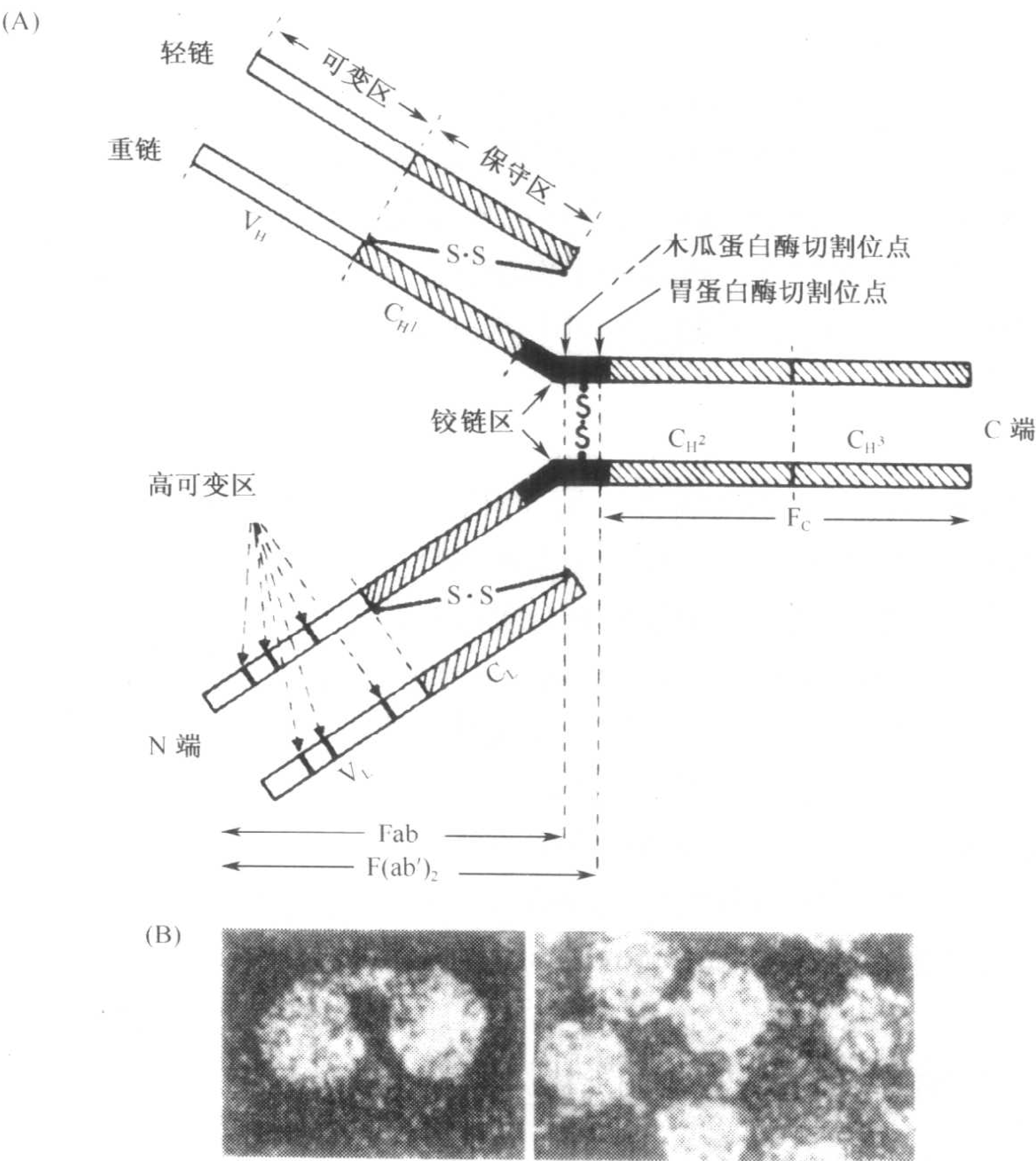


图 15.6 （A）IgG 抗体分子。箭头指向木瓜蛋白酶和胃蛋白酶切割产生 Fab、Fc 和 F（ab′）$_2$ 片段的特异位点。L：轻链；H：重链。4 个多肽链分子通过二硫键相连。两个抗原结合位点由 L 链和 H 链的可变区组成。引自 van Rege nmortel（1982）。（B）抗体-病毒复合体。电镜显微照片显示 STNV 粒子和病毒特异的 IgG 抗体分子相结合（承蒙 S. Höglund 提供照片，谨致谢意）。引自 Matthews（1991）。

每一个“Y”形结构包括 4 个多肽：形成重链（H 链）的两个相同拷贝的多肽及形成轻链（L 链）的两个相同拷贝的多肽，通过二硫键相结合。依据“Y”形结构单元的数目和重链多肽的类型，抗体可分为 5 种类型：IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD（表 15.1）。

表 15.1　5 类免疫球蛋白

特性	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
重链	γ	μ	α	ε	δ
轻链	κ 或 λ	κ 或 λ	κ 或 λ	κ 或 λ	κ 或 λ
分子式	$\gamma_2\kappa_2$或 $\gamma_2\lambda_2$	$(\mu_2\kappa_2)_5$或 $(\mu_2\lambda_2)_5$	$(\alpha_2\kappa_2)_n$或 $(\alpha_2\lambda_2)_n$*	$\varepsilon_2\kappa_2$或 $\varepsilon_2\lambda_2$	$\delta_2\kappa_2$或 $\delta_2\lambda_2$
化合价	2	10	2，4 或 6	2	2
血清浓度(mg/ml)	8～16	0.5～2	1～4	0.01～0.4	0～0.4
功能	次级反应	初始反应	保护黏膜	防护寄生物	?

* n=1、2、3。

IgG 分子有 3 个蛋白质结构域，其中组成“Y”形结构两个臂的两个结构域是相同的，称为 Fab 结构域，每一个 Fab 末端包含一个抗原结合位点，因此 IgG 分子为二价的。第三个结构域为 Fc 结构域，组成“Y”形结构的茎。经木瓜蛋白酶消化，这 3 个结构域可以彼此分开。Fc 结构域与 A 蛋白［protein A，一种来源于金色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）细胞壁的蛋白质］结合，具有非常高的亲和力。这一特性已在几种血清学方法中得到了应用。

“Y”形 IgG 分子臂部分的轻链和重链的 N 端区域序列同源性非常低，即抗体所谓的可变区。轻链的 C 端和重链分子的可变区外的其余部分构成了所谓的不变区。一条重链和一条轻链的可变区共同组成了抗原结合位点。可变区序列的这种多样性构成了高效免疫系统中的众多结合位点的结构基础。Harlow 和 Lane（1988）详细讨论了可变区的可变特性及其产生的原因。

2. 抗原

抗原通常是大的蛋白质或多糖分子，或是包含这些分子的粒体。这些蛋白质或多糖是被注入抗原的脊椎动物本身所不具有的。小于 10 kDa 的多肽也能诱导抗体的产生，但大多数抗原的分子质量都超过 10 kDa。一个抗原具有两种活性，一种是能够激发动物产生与之特异性反应的抗体蛋白，这种性质被称为抗原的免疫原性（immunogenicity）；另一种是抗原必须能与其诱导产生的特异性抗体相结合，这种性质通常被称为分子的抗原性（antigenicity）。一些具有特定结构如氨基酸的小分子，其本身可能不具有免疫原性，但可以和含有这种小分子的较大抗原诱导产生的抗体相结合，这样的小分子称为半抗原（hapten）。

通常大分子比小分子的免疫原性强，因此包含蛋白质大分子的植物病毒常常能非常有效地刺激特异性抗体的产生，而单一的病毒蛋白外壳亚基的刺激效率要低得多。

表位（抗原决定基，epitope）是抗原上的特定区域，它能够诱发特定的抗体产生并且能与该抗体特异性地结合。表位在组成成分上可以是氨基酸、糖类、脂类、核酸，也可以是人工合成的有机物。蛋白质表面上的 7～15 个氨基酸可构成一个抗原位点（antigenic site）。目前对它更精确的定位尚存在许多困难，详细资料可参考 van Regenmortel（1998b）的文章。

表位的类型

表位有几种不同的分类方法。一种是将其分为两类：连续表位（continuous

epitope）和非连续表位（discontinuous epitope）。它们的不同之处在于连续表位是由线性氨基酸链组成，而非连续表位则是由在空间上因多肽链的折叠、两个或两个以上分离的多肽链的并列（juxtaposition）而相互毗邻的表面氨基酸残基组成。第二种分类法将表位分为4类：①隐位（隐蔽决定簇，cryptotope），通常状态下它们被遮盖住，只有在抗原解体或变性时才得以暴露；②新表位（neotope），是由相邻肽链（如相邻的病毒衣壳蛋白亚基）的并列形成的；③变位表位（metatope），在解离的或聚合的抗原中都存在；④中和表位（neutralization epitope），能被抗体分子特异性识别并因此而中和病毒的侵染性。van Regenmortel（1992）对病毒表位的构象特异性进行了论述。产生单克隆抗体的表位的类型和多克隆抗体识别的表位的相对比例都会影响特定免疫学反应的结果。例如，具有隐位的抗体在双抗夹心 ELISA（DAS-ELISA）中不能识别特定抗原，而在 Western 印迹（Western blot）中就能够识别。

有人推测，当抗体分子识别的蛋白质表面积为2.0 nm×2.5 nm左右时，这一蛋白质所有的抗原决定簇（antigenic determinant）可能都是不连续的（Barlow *et al.*，1986）。所有不同类别的病毒的四级结构所特有的抗原决定簇已被列出（van Regenmortel，1982）。这些决定簇已在杆状的烟草花叶病毒（TMV）中得到证实，在针对TMV完整粒体的18个单克隆抗体中，有8个在与病毒亚基的ELISA反应中为阴性（Alschuh *et al.*，1985）。

van Regenmortel（1984b）介绍了利用单克隆抗体进行抗原的分子解析的方法。定位抗原决定簇有3种不同的方法可供选择：①先利用化学法或酶切法将肽链从蛋白质中分离出来，再与抗体分别反应，从而筛选出抗原决定簇；② 根据蛋白质的已知氨基酸序列人工合成出较短的肽链，再根据方法①进行筛选；③ 在已知位点有一个或几个氨基酸替换的蛋白质之间可进行免疫交叉测定。

以上每种实验方法都存在很大的局限性。有时溶液中由切割或合成产生的肽链并不能保持它在完整分子的构型，而且这些肽链分子极少能代表原抗原决定簇中的所有氨基酸。因此，这些肽链与包含这些肽链的完整蛋白质分子的抗体反应时活性很低。

对TMV的研究也表明上述肽链方法的局限性：用一系列合成或切割产生的肽链分子的研究表明，TMV蛋白分子解体后有7个抗原决定簇（Alschuh *et al.*，1983）；同时，用几乎代表蛋白质全长的合成肽链的研究结果显示，只有接近全长的氨基酸序列才有抗原活性（Al-Moudallal *et al.*，1985）。

3. 抗原与抗体的反应

表位与抗体间的相互作用既受亲和力（affinity）的影响，又受亲合力（avidity）的影响。

a. 亲和力

亲和力是用来衡量表位与抗体间相互作用力的大小。因为抗原与抗体间的结合是可逆的生物分子间的反应，因而亲和力就是描述反应到达平衡状态时的抗原-抗体复合物的量。高亲和力的抗体用于免疫化学技术中效果更好，不仅其自身的反应活性高而且形成的抗原-抗体复合物也很稳定。

b. 亲合力

亲合力用来衡量抗原-抗体复合物总体稳定性的指标，由 3 个因素决定：①抗体与表位间本身的亲和力；②抗原和抗体分子的（化合）价（valency）；③互作组分的空间排列方式。

c. 效价

效价（titer）是用来衡量抗血清中特定抗体的相对浓度的指标。通常用来确定检测抗原的抗体的稀释终点。因此，由于不同的血清学反应其灵敏度不同，表观效价仅限于一定的测试。

d. 血清学区分指数

血清学区分指数（serological differentiation index，SDI）是用来衡量两种抗原间的血清学交叉反应活性的指标，其数值为区分同源效价和异源滴定的 2 倍稀释的次数。同源效价是抗体与用来免疫动物的抗原间的 2 倍稀释次数；异源效价是抗体与另一种相关抗原间的 2 倍稀释次数。因为动物对抗原的反应不同，只有经几次重复实验得出的血清学区分指数的平均值才是可靠的。SDI 的测定方法有多种，如 ELISA 和单向免疫扩散实验（Krajacic *et al.*，1992）。

4. 抗体的类型

抗体分为两个基本类型：多克隆抗体和单克隆抗体。前者是针对抗原上的所有抗原决定簇产生的多种抗体的集合，后者是只针对一种抗原决定簇产生的一种抗体。究竟哪种抗体更适于抗原检测，不同的人有不同的看法，不过一般应根据诊断者所要解决问题而定。单克隆抗体比多克隆抗体特异性高，因此更适于区分同一病原的不同株系。例如，许多单克隆抗体就是病毒属特异的，如马铃薯 Y 病毒属。另一方面，有时特异性太高反而不好，可能因此而检测不到变异了的病原物。

5. 抗体的生产

许多动物都可以用来生产植物病毒的抗体。用得最多的是兔子，因为它们能够对植物病毒产生很好的抗原反应，而且操作方便，抗血清的产量也够用。同种动物的不同个体对同一抗原的反应也可能变化很大。对于特定的植物病毒抗原产生的抗体的量和特异性可能是由免疫动物本身的遗传性决定的。不稳定的植物病毒经化学的稳定性处理可增加其免疫原性（Francki and Habili，1972）。抗体的生产以及除去与寄主抗原反应的抗体的实验步骤可以参照 van Regenmortel（1982）、Hampton（1990）和 Dubs（1993）等人的报道。最近的一种新方法是注射含有抗原蛋白序列的 cDNA 的一种哺乳动物表达载体。利用这种方法已经成功的制备了大麦黄矮病毒（BYDV）的抗体（Pal *et al.*，2000）。

虽然小白鼠产生的抗体相对较少，但可用于病毒抗原用量较少的时候。亲缘关系越近的鼠免疫反应的差异越小，小白鼠和大鼠都常用来生产单克隆抗体；鸡常用来生产多克隆抗体，产蛋的母鸡经免疫处理后，在相对较短的时间内就可以从卵黄中得到大量的纯 IgG 蛋白（van Regenmortel，1982；Polson *et al.*，1985；Bollen *et al.*，1996；Schde *et al.*，1997）。

从兔子产生的抗体中纯化 IgG 的方法是先分离病毒和 IgG 蛋白结合体，再在低 pH 条件下将两者分开，经高速离心去除病毒即可。或者为了避免长时间的酸处理，可以加入戊二醛，经其多聚化作用后抗体和病毒可形成不溶物，经酸处理后再短时间的低速离心就可以去除病毒（Maeda and Inouye，1985）。

长期以来人们都一直认为植物不会产生抗体。但是，正如第 16 章（第Ⅶ节 C. 3 部分）所述，转基因植物也能用于制备抗体。

6. 单克隆抗体

为了克服 B 淋巴细胞不能体外培养这一难题，Kohler 和 Milstein（1975）从经过免疫处理的小白鼠中取出 B 淋巴细胞，在离体条件下使其与能够无限生长的鼠骨髓瘤细胞系（mouse myeloma cell line）融合，再挑选适当的单个融合细胞——杂交瘤（hybridoma），这种杂交瘤细胞就能专一地生产一种抗体，即单克隆抗体（monoclonal antibody，MAb）。

自从 TMV 的单克隆抗体被制备（Briand *et al.*，1982；Dietzgen and Sander，1982）后，单克隆抗体在植物病毒研究的很多方面，尤其是在病毒诊断和鉴定方面的应用引起了人们极大的兴趣。单克隆抗体有许多简写方式，如 MAb、McAb、MA 以及 McA 等，本书将采用第一种简写方式。截至 1986 年，已对 30 多种不同的植物病毒制备出了单克隆抗体（van Regenmortel，1986），此后又有许多关于单克隆抗体制备的报道。

a. 相对于 MAb 的抗体的特异性

单克隆抗体（或者是多克隆抗血清中任一种抗体）的结合位点（binding site），能够与不同的抗原决定簇以不同的亲和力相结合，也就是说，抗体上的每个结合位点都是多功能的（polyfunctional）。而且，不同抗体对同一抗原决定簇（或表位）的亲和力不同，可以从常规技术难以检测的水平上升到百万倍以上的显著水平。因此，对某一抗体而言，它与其他抗原决定簇的结合有可能比与产生这种抗体的抗原分子之间的结合还要强。多克隆抗血清中存在多种不同的抗体使得这种现象更加复杂，而利用单克隆抗体时就很清晰。例如，免疫小白鼠获得 TMV 某一株系的单克隆抗体时，人们发现一些单克隆抗体与其他株系之间的反应更强（Al-Moudallal *et al.*，1982；van Regenmortel，1982）。这表明单克隆抗体可以应用于不同病毒株系的界定（参见第 17 章第Ⅱ节 B. 3 部分）。

一种单克隆抗体只能与特定的表位反应，而一组单克隆抗体则可以对应多种不同的表位。例如，1988 年 Dore 等就据此将与解离的 TMV 粒体反应的单克隆抗体（可能为隐位）和与完整的病毒粒体（可能为新表位）反应的单克隆抗体进行了区分。电镜观测结果表明，新表位与病毒粒体的整个表面相关，而隐位只与病毒杆状粒体末端和盘状蛋白聚集体相关。

单克隆抗体的特异性还具有其他方面的特点。某一特定的蛋白质抗原可能只有一个抗体结合位点，如果另一种蛋白质也具有此位点，即使这两种蛋白质之间不存在结构相似性，也会发生免疫交叉反应。但这种情况并不常见。如果没有其他的实验证据，只根据用单克隆抗体得到的交叉反应不能推断出这两种蛋白质之间具有显著的结构或功能的

相似性（Carter and ter Meulen，1984）。

b. 单克隆抗体的制备

Sander 和 Dietzgen（1984）、Harlow 和 Lane（1988）以及 Hampon 等（1990）报道了植物病毒单克隆抗体制备的具体方法。Torrance 等（1986a，b）报道了利用大鼠制备单克隆抗体的方法。图 15.7 为利用小白鼠制备单克隆抗体的实验流程示意图。

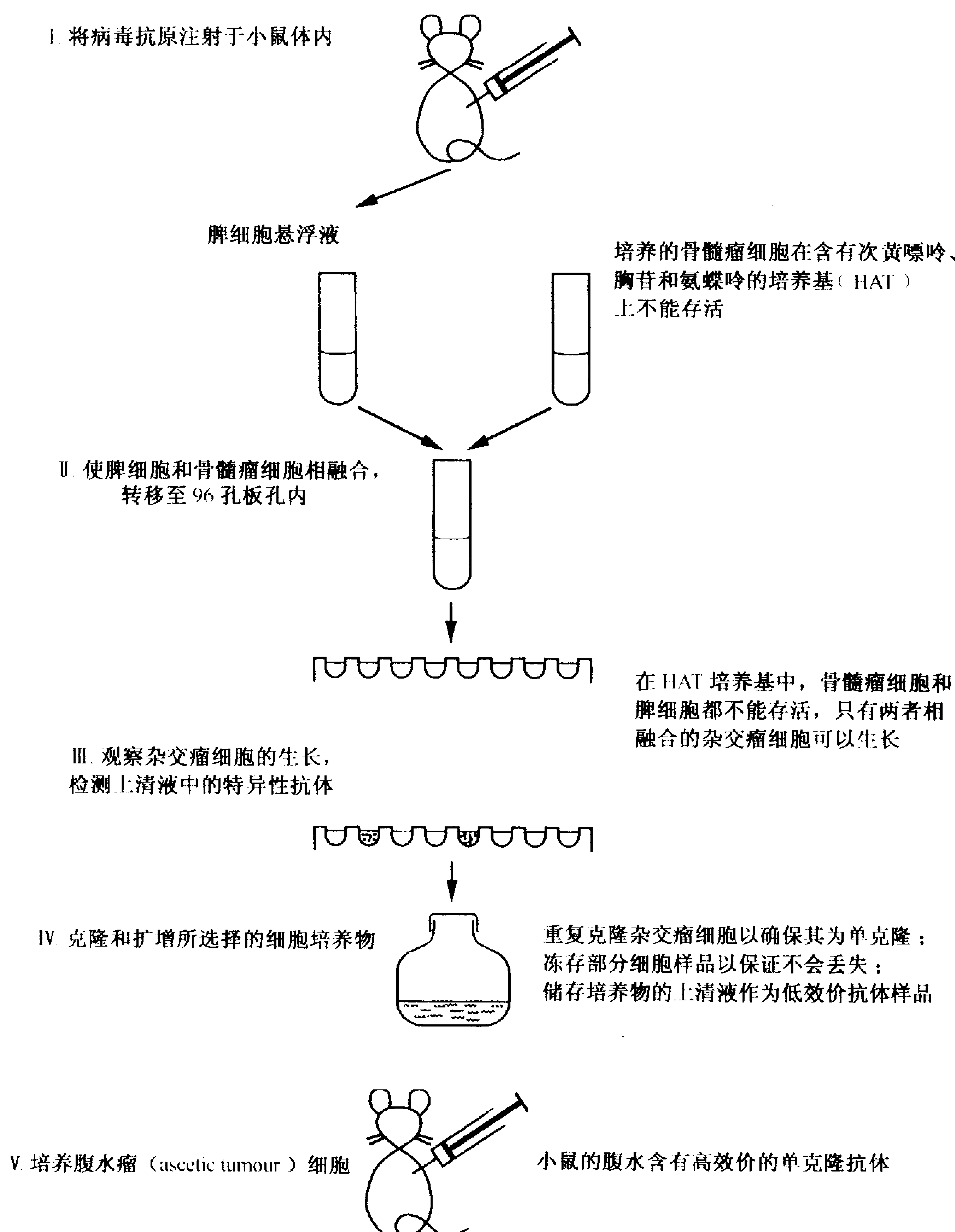


图 15.7 单克隆抗体的制备过程。引自 Matthews（1991）。

检测单克隆抗体制备结果的方法非常重要（van Regenmortel，1986）。许多人用不同形式的 ELISA 方法做检测。多层夹心 ELISA，尤其在其中一层使用鸡产生的抗体，是最灵敏的方法（Al-Moudallal *et al.*，1984）。所得到的实验结果往往取决于所用试剂

的质量、介质的 pH 及其他因子等具体的实验条件。

7. 单链抗体和噬菌体展示技术

单链抗体的制备和重组蛋白在噬菌体表面的展示（噬菌体展示，phage display）这两项技术的融合使人们能够在不对实验动物注射抗原的情况下制备出多种与单克隆抗体相似的单一类型的抗体分子。

据估计，脊椎动物的抗体库大约由 10^8 种以上不同抗体组成，抗体间的不同是由免疫球蛋白的重链可变区（V_H）和轻链可变区（V_L）的不同序列决定的（图 15.6）。通过 V_H和 V_L 编码序列的 RT-PCR 后再进行 cDNA 克隆可以扩增出抗体库的基因序列（Orlandi *et al.*，1989；Sastry *et al.*，1989）。将两种可变链序列通过一种柔韧性的连接蛋白（flexible linker protein）序列相连接，可在大肠杆菌中表达出以单链可变片段（scFv）的融合蛋白形式存在的 V_H和 V_L（Huston *et al.*，1988）。克隆随机组合的 V_H 和 V_L 序列能够产生一系列编码 scFv 的基因，由此可以制备出大型的重组抗体库，其多样性可与天然免疫系统相比拟（Huse *et al.*，1989；Marks *et al.*，1991）。

噬菌体展示技术取决于能将编码序列插入到展示在噬菌体表面的蛋白质的结构基因中，且不会破坏基因产物的基本功能。如果插入的是一系列随机序列，得到的所有噬菌体克隆就是一个多肽文库，每一种多肽展示在一个噬菌体克隆的表面（详见 1999 年

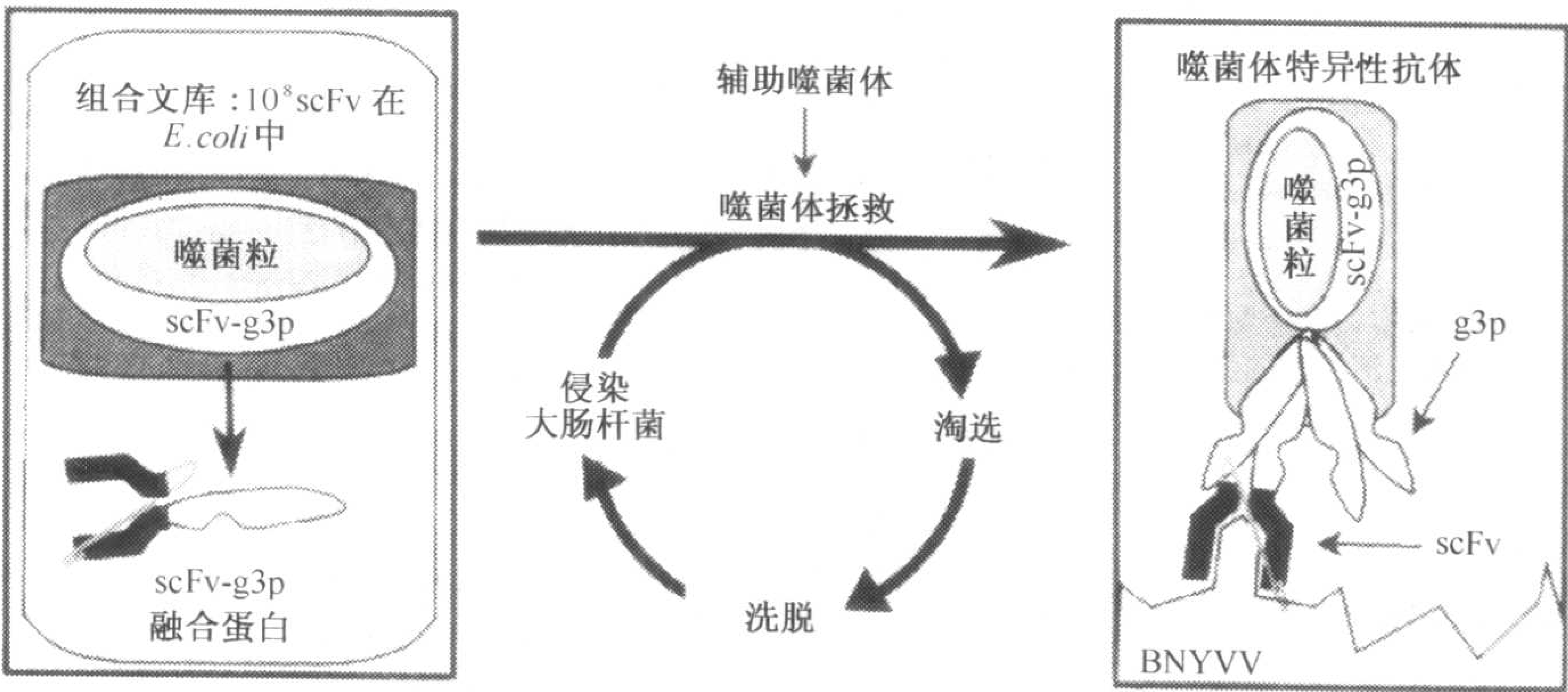


图 15.8 抗体工程和噬菌体展示技术筛选抗原特异性抗体的略图。抗体识别抗原的最基本的部位是抗原结合位点。利用编码连接肽（linker peptide）的 DNA 片段使抗体 V_H 和 V_L 结构域相连并插入到噬菌粒载体中，即为单链 Fv（single-chain Fv，scFv）片段。编码 scFv 的噬菌粒含有一个氨苄青霉素抗性基因、一个 *E. coli* 复制起点和一个噬菌体装配所必需的包装信号。取决于利用的 *E. coli* 的株系的不同，scFv 在 HB2151 细菌中的翻译在位于 scFv 和 g3p 之间的琥珀型终止密码子处停止而能表达出可溶性蛋白；在 TG1 细菌中的翻译能越过这一终止密码子而产生 scFv 和丝状噬菌体 Fd 的次要外壳蛋白的融合蛋白。利用噬菌体展示技术可以从组合抗体文库中筛选出 BNYVV 特异性的 scFv 抗体。辅助噬菌体含有全部的噬菌体基因组，但缺少有效的包装信号，已被用来从组合抗体库中拯救噬菌粒。当辅助噬菌体和噬菌粒共存于同一细菌中时，噬菌体抗体就会被组装，新形成的噬菌体表面带有 scFv 抗体且含有编码 scFv 的噬菌粒载体。结果，在 PhAb 中，基因型和表现型相关联。筛选抗原特异性的抗体时，应使从组合抗体文库中拯救的 PhAb 与固定的 BNYVV 相结合（panning），该过程称为淘选。洗掉与 BNYVV 没有亲和力的 PhAb，再将结合的 PhAb 洗脱下来，重复进行淘选直到得到具有望亲和力的 PhAb。承蒙版权所有者（© Kluwer Academic Publishers）惠允，引自 Griep 等（1999）。

Rodi 和 Makowski 的综述)。噬菌体展示技术中通常使用的是丝状噬菌体 M13 和 fd,其结构蛋白较小,通常位于噬菌体的粒体或主要外壳蛋白的末端(Gao *et al.*,1999)。以上这两种蛋白质都已用于重组蛋白的展示。

利用单链抗体和噬菌体展示技术已将所有的 scFV 分子在噬菌体表面表达(McCafferty *et al.*,1990)。展示目标抗原(如病毒的外壳蛋白)的抗体的噬菌体可通过与固定在微量平板上的抗原间的结合(panning)进行筛选,与目标抗原结合的噬菌体被洗脱分离后用于侵染大肠杆菌(图 15.8)。这样经几次结合、洗脱、再侵染循环,就可得到符合亲和力要求的抗体。Fv cDNA 文库并不都是从对目标抗原有免疫反应的动物中得来的,从未经免疫反应的动物中得到的抗体称为幼稚(naive)抗体。

B. 检测抗体-病毒结合的方法

现已建立了很多能够证明或推测抗体和抗原结合的方法。其中一些方法,如补体结合和过敏性反应实验,在植物病毒学研究中很少应用,在此不做深入讨论。大多数利用植物病毒抗血清的传统方法都涉及直接观察在液体基质或琼脂凝胶中病毒与抗体形成的特异性沉淀。在过去的 20 多年里,这些方法已逐渐被酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫吸附电镜(ISEM)以及使用单克隆抗体或多克隆抗体的点杂交法所淘汰,这些技术在下面的章节中将有详细的论述。

1. 血清学技术的优缺点

血清学反应为植物病毒的检测和鉴定提供了快速、方便地的方法,它的优势在于:①反应特异,能在寄主组织和其他杂质存在的情况下检测到病毒;②反应迅速,几个小时或一夜内就能得到结果,而侵染性实验则需几天甚至几周时间;③数量化,在很大范围内实验结果与病毒的浓度间存在比例关系;④灵敏,一些血清学方法比侵染性实验更灵敏;⑤有些病毒不能由汁液传播,也没有合适的局部斑鉴别寄主,血清学方法能够有效的解决这类病毒的测定难题;⑥抗血清可长期储存,而且不同时间不同实验室做出的实验结果可以相互比较。

需要指出的是血清学方法检测和计量的是病毒的蛋白抗原,而不是有侵染活性的病毒。有些情况下可以利用这种性质。

偶尔也可能发生交叉反应,这一点也需要注意。在蛋白质表面,蛋白质序列上的少数几个氨基酸就能诱发抗体与此蛋白质序列结合;因此从理论上讲,即使两种毫不相干的蛋白质也有可能因为有很短且相似的氨基酸序列而引发交叉反应。这种相似性现已得到了证实:在 TMV U1 株系中,外壳蛋白就和寄主的二磷酸核酮糖羧化酶有非常高的同源性(Dietzgen and Zaitlin,1986)。

血清学反应构成了许多测定和诊断技术的基础。除此之外,还可应用在其他许多方面,如病毒结构的研究(参见第 5 章)、病毒间亲缘关系的研究(参见第 2 章和第 17 章)以及病毒在细胞内的活动规律的研究等(参见第 10 章)。van Regenmortel (1982)、van Regenmortel 和 Dubs (1993) 等报道了这些实验的具体操作步骤。

2. 沉淀反应方法

a. 液体基质中的沉淀反应

抗原和抗体能够形成特异性的可见沉淀，因此可直接观察确定抗原和抗体发生的结合反应，但是该实验所需反应物的浓度较高。

植物病毒是多价的，即每个病毒粒体能与多种抗体蛋白分子相结合，而实际能结合的分子数目取决于病毒抗原体积的大小。多价抗原与二价抗体结合后形成一种网状结构的沉淀。在反应温度和混合方式的标准条件下，如进行一系列反应混合物中两种反应物2倍稀释的测试，可清晰地描绘出一种病毒和特定抗血清的沉淀反应（Matthews，1975）。

试管沉淀反应的一种改进的形式被称为成环试验（ring test）。先将少量的未经稀释或稍微稀释的血清放在玻璃试管中，再小心的将病毒抗原溶液平铺上去。抗体很快就会渗透到抗原溶液中去，同时抗原也渗透到抗体溶液中来。只要抗原和抗体的浓度足够高，在二者分界面附近就会形成一个特异的沉淀带。这种方法非常快速而且实用，但是灵敏度不够高。

从被高浓度病毒侵染的植株叶片中榨出一滴汁液，滴在显微镜玻片上使其与高浓度的抗血清混合，寄主材料的微小颗粒就会聚集成块，有时肉眼就可以观察到这种块状物，但在放大镜或低倍显微镜下观察会更清晰。聚集的块状物主要是叶绿体及其碎片。有些病毒，如WSMV，在叶片提取液中能很快发生抗原修饰，除非使用戊二醛固定液（Langenberg，1989）。

b. 将病毒结合在较大粒子上的沉淀反应

沉淀反应的灵敏度取决于产生可见沉淀所需的最少抗原数量。抗原越小，所需的抗原量就越多。现在已建立了许多新的方法，例如，先将病毒吸附到较大粒子如乳胶或红细胞上，再与抗血清发生反应。与单一的沉淀反应相比，这种处理能将病毒检测的灵敏度提高100～1000倍（van Regenmortel，1982）。对于6种侵染豆科植物的杆状病毒，乳胶微粒能将其检测灵敏度上升到0.1～0.5 μg/ml（Demski *et al.*，1986）。一种利用乳胶微粒制作的能检测3种马铃薯病毒的田间试剂盒可以在3～10 min内得到检测结果（Talley *et al.*，1980）。乳胶外面包裹上A蛋白更能增加这种方法的灵敏度（Torrance，1980）。

在反向被动红血球凝集作用（reverse passive hemagglutination，RPH）中，抗体经适当处理后非特异地连接到红细胞上，再将病毒溶液加到圆底微量滴定板上的这种抗体偶联的红细胞悬浮液中。如果反应为阴性，细胞呈实心纽扣状；如果反应为阳性，则会发生凝集反应，试管底部出现细胞层。Sander等（1989）以TMV为模式系统，证明了RPH与双抗夹心ELISA方法灵敏度相当。这种方法简单，仅需一步，并且无需借助其他设备，90 min内就能用肉眼直接观察结果。经正确固定处理的红细胞能够长期保存。

此外，Dijkstra和de Jager（1998）还报道了叶绿体凝集实验的操作方法。

c. 凝胶免疫扩散反应

凝胶免疫扩散反应（immunodiffusion reaction）方法的优越性在于：①能将混合的

抗原分子和相应的抗体彼此分开，这是由于它们在凝胶中的扩散率不同或者在免疫电泳的电场中的迁移率不同，也可能是因为这两种因素综合作用的结果；②将两种抗原置于同一板的相邻的样品槽内可以直接比较两种抗原的血清学特性。在能检测到的病毒浓度方面，这种方法可能没有试管沉淀法灵敏，但是所需的反应物的量要少得多。早期的免疫扩散实验是在小试管中单向进行的，现已被在玻片上进行的双扩散反应所取代。Ouchterlony（1962）对这些方法进行了报道。

双扩散实验是按照特定的几何排列在琼脂或琼脂糖凝胶上打孔，通常将抗血清置于中央孔内，而将待测的一系列抗原置于中央孔周围的孔中。如果测试一种抗原和多种抗血清的关系，如在病毒测定实验中，可将抗原置于中央孔内。抗原和抗体在凝胶中相向扩散，一段时间后在适当比例的抗原和抗体相遇处两者形成沉淀复合体，在这一位置形成一个区带，形成复合体的两种反应物脱离溶液。进一步扩散，更多的相关的抗原和抗体在这一区带相遇结合而形成可见的沉淀线；不相关的抗原和抗体能穿过沉淀线。沉淀线可在适当的光照下直接观察，或经蛋白质染色及照相后观察。如果病毒经处理带有放射性，也可以应用放射性自显影检测沉淀线。

比较相邻孔内两种抗原形成的沉淀线时，有几种不同的模式。抗原在琼脂凝胶中的运动和病毒的大小、形状极其相关。双扩散实验更适合用于等轴的小的植物病毒的研究中，而杆状病毒扩散地很慢或者根本不扩散。常规测试时，在免疫扩散系统中添加适当的变性剂能使病毒降解，降解产物可在凝胶中迅速迁移。长的病毒粒体也可通过声波处理而使其能在凝胶中扩散，声波处理的优点是病毒原有的抗原表面仍存在于处理后的片段内（Moghal and Francki，1976）。

利用相邻孔形成的沉淀线的相互关系可以确定病毒间的血清学关系。血清学关系一致或非常密切的病毒形成的沉淀线相互融合，而血清学关系稍远的病毒形成的沉淀线相交叉（图 15.9）。

一种改进的凝胶扩散的方法是利用来源于伊乐藻假单胞菌（*Pseudomonas elodea*）的类似于琼脂的多糖脱乙酰吉蓝糖胶（Gelrite）来取代琼脂。使用 Gelrite 检测抗原速度更快，灵敏度能提高 100 倍，在这点上，几乎可与 ELISA 相比（Ohki and Inouye，1987）。

d. 凝胶免疫电泳

在免疫电泳（immunoelectrophoresis）中，首先依据抗原的电泳迁移率的不同来分离抗原混合物，然后将抗血清置于与电泳迁移路径相平行的凹槽内，再通过免疫扩散实验进行分离。这是分离抗原混合物的一种非常有效的方法。涉及两个独立的标准：电泳迁移率和抗原特异性。

免疫渗透电泳（immuno-osmophoresis）是在缓冲液 pH 近于 7 的凝胶中设两组胶孔，每对胶孔中，一个加入抗血清，另一个加入病毒稀释液，在电压梯度下，抗体蛋白由于渗透而移动，病毒因带有负的净电荷而迁移，这样，比起简单的凝胶扩散，两种反应物在凝胶中的相互结合更迅速（John，1965）。

火箭免疫电泳（rocket immunoelectrophoresis）是指在电场中抗原在含有适宜抗体的琼脂糖凝胶中朝着正极迁移的过程中产生火箭形的沉淀。火箭形沉淀所占的面积与抗原的浓度成正比。这种方法已被用于测定约 25 mg 寄主植物叶片的提取液内25 ng～10 μg 的 CaMV（Hagen *et al.*，1982）。

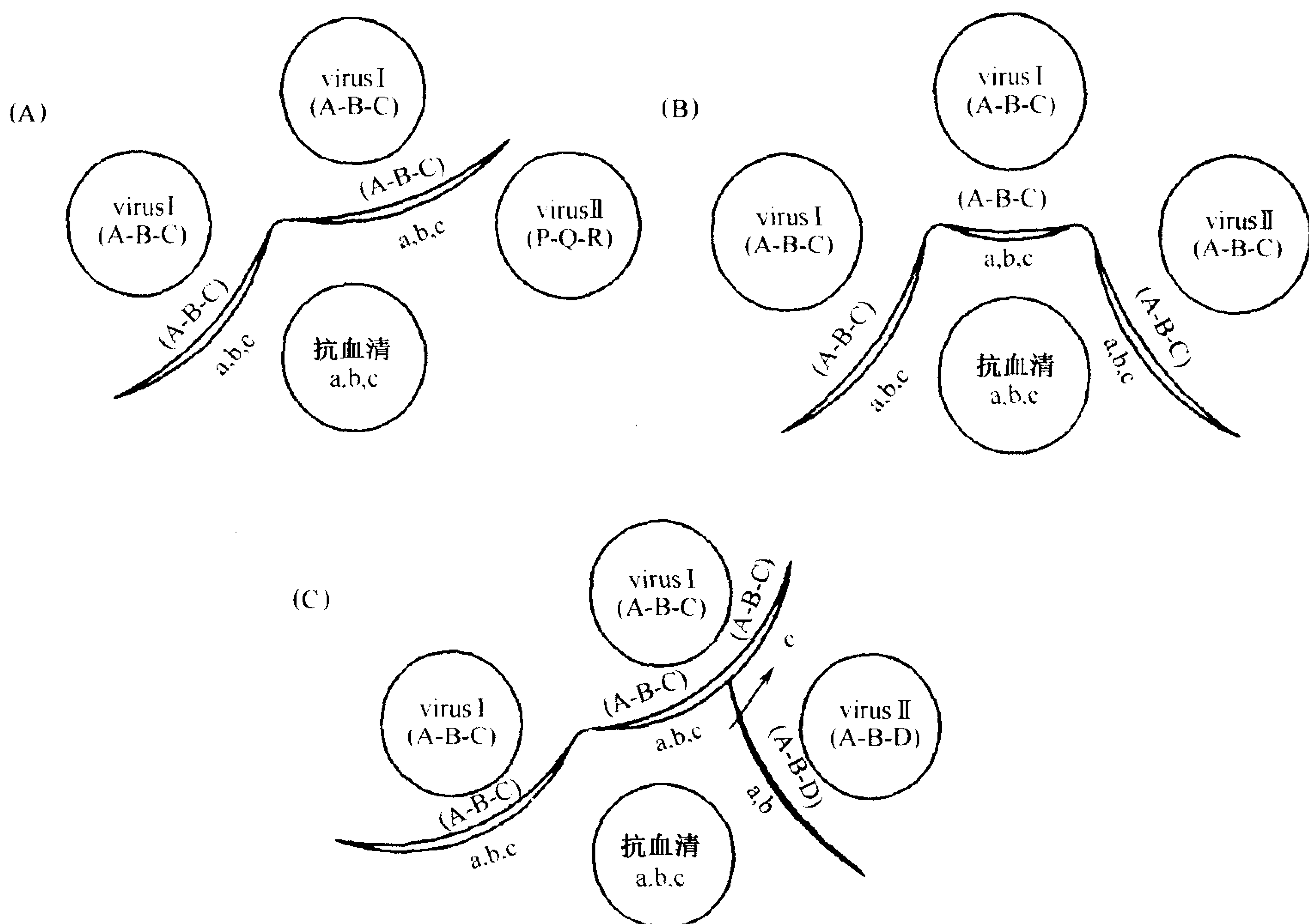


图 15.9 凝胶双扩散实验中表明两种病毒（Ⅰ和Ⅱ）的血清学关系的可能的沉淀线形式。反应物的安排表示在孔内。病毒外壳蛋白的抗原决定簇为 A、B、C、D、P、Q 或 R。它们与外壳蛋白分子和病毒粒体的关系由连字符和括号表示。病毒Ⅰ（抗原决定簇 A-B-C）的抗血清含有分别产生的抗体 a、b 和 c。承蒙版权所有者（© Springer-Verlag GmbH and Co. KG）惠允，引自 Dijkstra 和 de Jager（1998）。

3. 放射免疫分析

放射免疫分析（radioimmune assay）使用放射性标记的病毒作抗原，病毒的抗体不可逆的附着在一次性管的壁上，最后测定结合在管壁的标记病毒的量。这是一种灵敏且特异的测定植物病毒抗原的方法（Ball，1973）。鉴于目前应用的 ELISA 方法的灵敏度，这种检测方法不可能得到广泛的应用。

4. ELISA 方法

Clark 和 Adams（1977）表示，使用酶联板的 ELISA 方法可以非常有效地检测和分析植物病毒。此后，这种方法的应用越来越广泛。已有许多最初的基本方法的演变形式，旨在优化特定的实验目的。

ELISA 在使用试剂方面非常经济，易于定量测定，可应用纯化的或粗制的病毒制剂为样品，能检测和分析各种形态的病毒。进行大样本测定时使用这一方法尤其方便，而且非常灵敏，检测浓度可低至 1～10 ng/ml。很多研究手册及期刊上都列出了这一方法的详细步骤，包括 Clark 和 Bar-Joseph（1984）、Hamilton 等（1990）、van Regenmortel 和 Dubs（1993）及 Dijkstra 和 de Jager（1998）的报道。总的来说，这一方法可分为两种类型。

a. 直接双抗夹心法

图 15.10 示意了直接双抗夹心（direct double-antibody sandwich）法的原理，而图 15.11 表示了利用 ELISA 得到的一些数据资料。这是 Clark 和 Adams（1977）所描述的方法，已被广泛使用。但是存在两个局限性：①这种方法的株系特异性很强，能非常

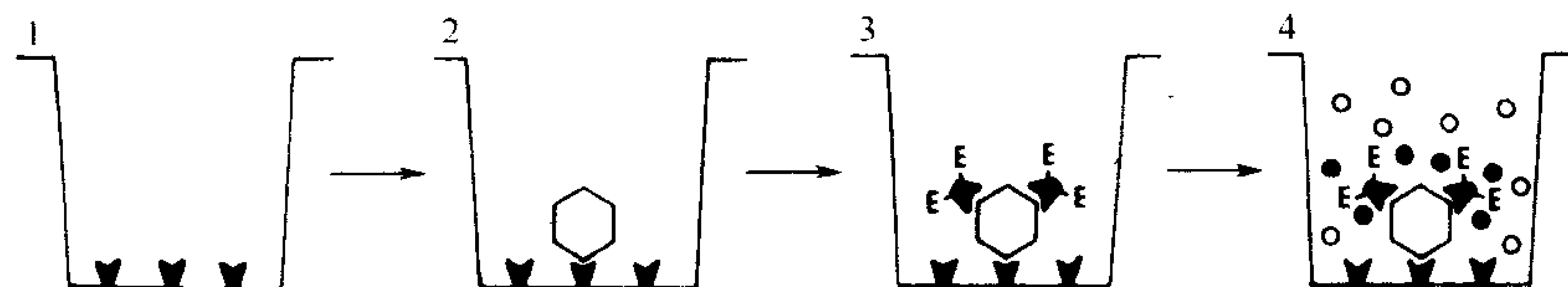


图 15.10 用于植物病毒检测的 ELISA 的技术原理（直接双抗夹心法）。①先用抗血清的球蛋白包被聚苯乙烯微量板的样品孔，接着洗板。②将含有病毒的待测样品加到样品孔内，使病毒与已固定的抗体相结合。③洗板，加入酶标的特异性抗体（碱性磷酸酯酶通过戊二醛与抗体相连），使其与孔中和固定抗体所结合的病毒相结合。④再洗板，加入酶作用的底物。无色的底物 p 硝基苯基磷酸（○）在酶的作用下生成黄色产物（●），在田间可进行目测，也可使用自动光谱仪测定 405 nm 的吸收值。图 15.11 给出了一个实验所得数据的例子。承蒙惠允，引自 Clark 和 Adams（1977），并进行了修正。

有效地区别不同株系，但对于常规诊断，可能检测不到不同血清型的病毒。如此高的特异性源于与抗体结合的酶能干扰血清学关系不很近的株系的弱免疫结合反应；②对于每一种待测病毒都需要制备不同的抗病毒的酶-抗体复合物。

b. 间接双抗夹心法

间接双抗夹心法在最后的检测和测定步骤中利用的酶结合在抗球蛋白抗体（anti-globulin antibody）上。例如，如果病毒抗体是由兔子产生的，那么用于酶标记的抗体就可能是鸡抗兔的免疫球蛋白。这样，与酶结合的一种球蛋白制剂可用于检测能和兔产生的抗体相结合的很多种病毒；而且，间接方法用单一抗血清可检测的相关病毒的范围相对宽一些（Koenig，1981）。

已有很多种这些方法的演变形式。Koenig 和 Paul（1982）研究了其中的 9 种，目的在于优化目的不同的实验（图 15.12）。

他们的结果强调了 ELISA 的应用是多种多样的，株系特异性不太高及病毒含量不很低的情况下，直接双抗夹心法是常规检测植物病毒的最方便的方法。使用非预先包被的酶联板的间接 ELISA 可检测

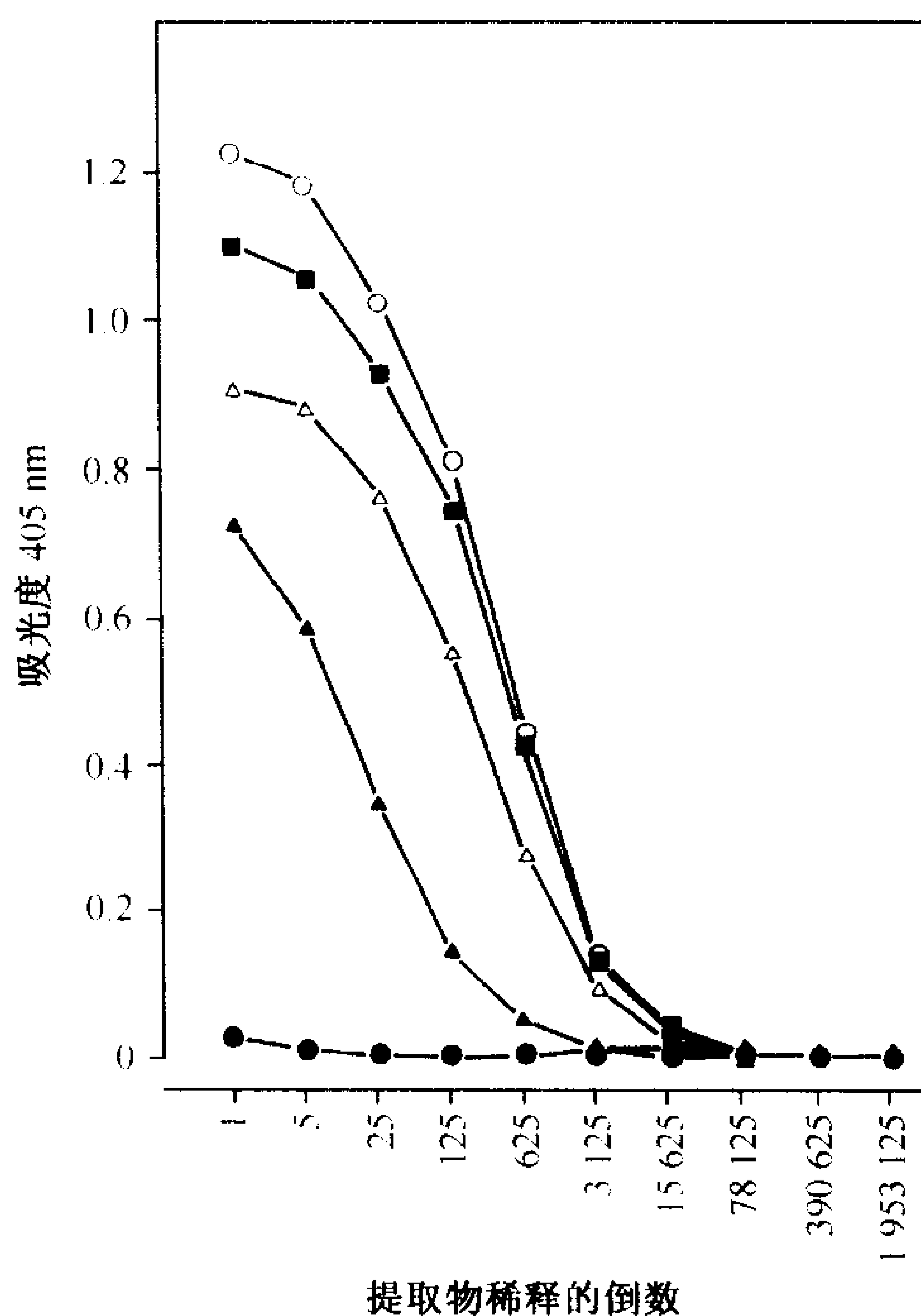
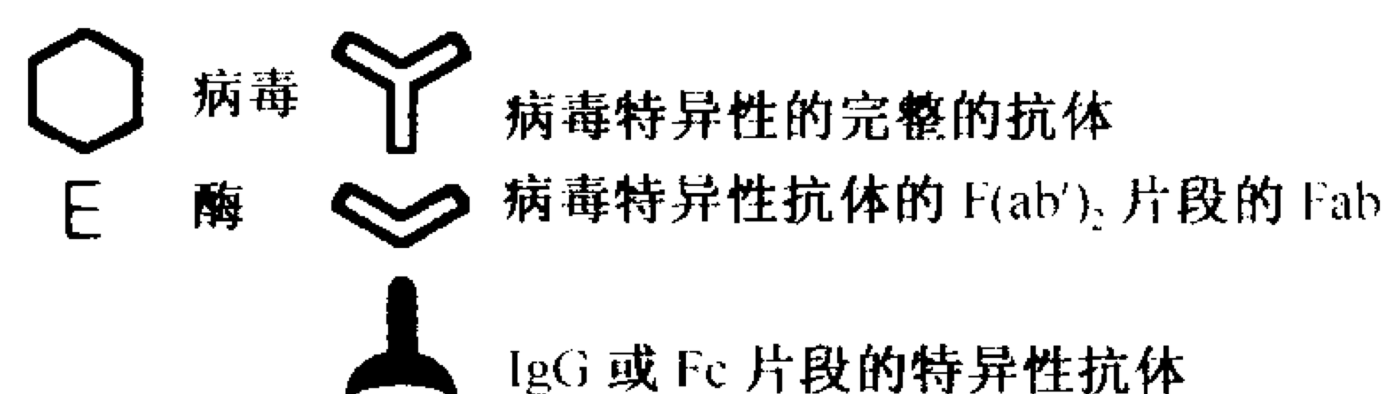


图 15.11 ELISA 测试得到的数据的例子。莴苣 LNYV 系统侵染心叶烟（*N. glutinosa*）的不同阶段的检测。●：健康植株；侵染 7 天的植株（没有系统症状，▲）；侵染 15 天的植株（明显的系统症状，■）；侵染 19 天的植株（明显的系统症状，○）和侵染 30 天的植株（严重的褪绿和矮化，△）。承蒙惠允，引自 Chu 和 Francki（1982）。



(1) 黑色与白色的符号代表来自不同种类动物的抗体
(2) 带阴影的区域表示一种病毒特异性抗体的 Fc 部分与一种 Fc 特异性抗体的反应
(3) 试剂加入的顺序为从图的下面开始，而方括号表示两种试剂先混合一起进行预保温，然后再加入到酶联板孔中

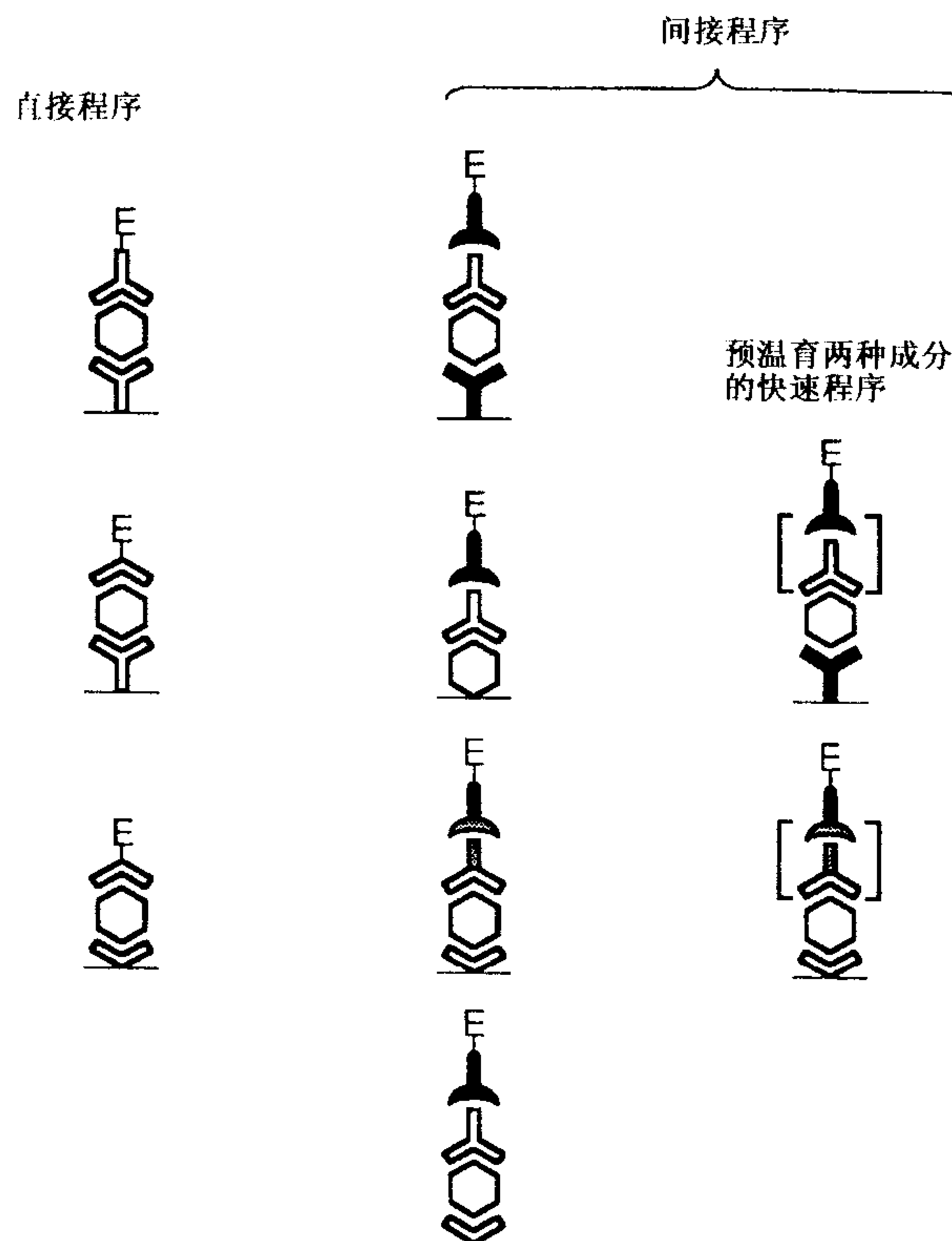


图 15.12　ELISA 的一些演变形式。承蒙版权所有者（© Elsevier Science）惠允，引自 Koenig 和 Paul（1982）并做了修正。

到的血清学相关的病毒的范围最广，但这一方法会受到病毒粗制剂中的植物汁液的干扰。用抗体或其 F（ab'）$_2$ 片段预先包被酶联板（Barbara and Clark，1982）可以消除干扰，但特异性降低了。还有其他形式的干扰，例如，草本植物的根可能含有一种因子，使用 A 蛋白-辣根过氧化物酶作为酶结合体时得不到令人满意的结果（Jones and Mitchell，1987）。其他包被病毒的蛋白，如马铃薯 Y 病毒属病毒的柱形内含体蛋白也可应用于 ELISA 诊断中（Yeh and Gonsalves，1984）。

c. 点 ELISA

现已有几种方法是采用硝酸纤维素膜或尼龙膜作为 ELISA 的固体基质。一种方法的第一步是把含有病毒的植物提取液电转移（electro-blotted）到膜上（Rybicki and

von Wechmar，1982），也可以把膜浸在适宜的溶液中而包被上抗病毒的 IgG（Banttari and Goodwin，1985）。最后的显色步骤是与 IgG 耦合的酶催化加入的底物生成不溶的有颜色的产物，有颜色的点的强度可用肉眼估计或用反射密度计测定。用这种方法检测 PLRV 的灵敏度是用微量板 ELISA 检测的 2 倍（Smith and Banttari，1987）。图 15.13 表示了应用这种检测方法的一个例子。

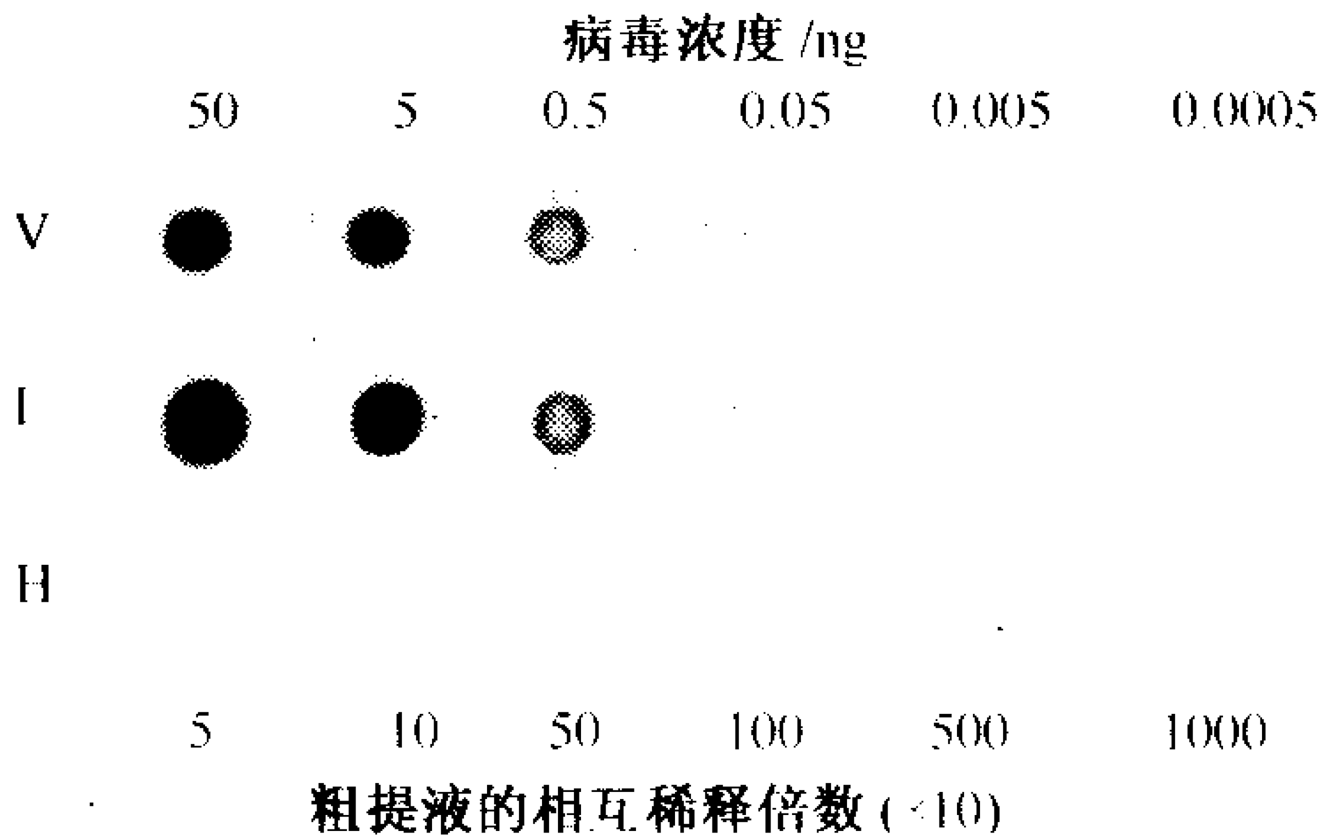


图 15.13 点免疫结合测定的灵敏度。V：纯化的 SPMYEV；I：受侵染植株叶片的粗提液；H：健康植株叶片的粗提液。偶联的酶为碱性磷酸酯酶，产生颜色的底物为固红（fast red）TR 盐。承蒙惠允，引自 Yoshikawa 等（1986）。

Hibi 和 Saito（1985）采用了这种点免疫结合的方法检测 TMV 的灵敏度仅是使用相似的微量板 ELISA 检测的千分之一，但仍可检测到 1.0 ng 的病毒。它的简便和快捷特性（几小时）使之成为很有用的应用性诊断技术。Graddon 和 Randles（1986）描述了快速检测 SCMoV 的单一抗体点免疫测定。以检测到的抗原的总量为标准，这一方法的灵敏度是 ELISA 的 12 倍。这一方法的主要优点是快速（3 h）、成本低及所需试剂量少。点印迹免疫测定可能特别适用于种子或取自种子的样品的病毒检测，尤其对于那些希望进行不很昂贵、简单的测定的实验室（Lange and Heide，1986）。但是，使用昆虫提取液时，昆虫体的内在酶类可能会干扰测定（Berger *et al.*，1985）。使用普通纸（plain paper）的点印迹免疫结合已用于诊断绿色叶片汁液中的 5 种马铃薯病毒（Heide and Lange，1988）。

将抗原点到硝酸纤维素膜或其他类型纸上的方法可与 ELISA 之外的其他方法相结合，用于抗原的检测。例如，Hsu（1984）使用金标记的山羊抗兔 IgG 检测硝酸纤维素膜上的结合于 TMV 的兔抗体，金标记的抗体可直接看到其粉红色。这一方法可检测到 1～5 pg TMV 蛋白，也很简单、经济。第Ⅳ节 I.2 部分将论述先进行蛋白质的电泳分离，再进行免疫印迹（Western 印迹）的应用。Koenig 和 Burgermeister（1986）讨论了各种免疫印迹技术的应用和可能会发生的没有被解释过的现象及假阳性反应问题。这些问题可能是由于免疫球蛋白和一些植物病毒的外壳蛋白的非特异性结合（Dietzgen and Francki，1987）。

d. 免疫组织印迹

免疫组织印迹（immuno-tissue printing）是点 ELISA 的扩展形式，是使植物的茎或叶（或任何其他的植物器官）的切割面接触硝酸纤维素膜，通过免疫探针显示出抗原（或者说是病毒的外壳蛋白）的存在。组织印迹的标准操作步骤已有报道（Holt，1992），也有几篇论文报道了这一方法的应用（Knapp *et al.*，1995）。

组织印迹法有几个优点：①能够显示出病毒在组织中的分布；②从病毒分布不均的叶片组织中提取汁液，会因有些细胞的汁液不含病毒，而使病毒浓度降低。由于组织印迹法是取样于切面上单个细胞的内容物，所以能增加灵敏度；③这一方法易于田间取样，组织印迹可在田间进行，不需要采集叶片到实验室提取汁液。

e. 其他一些衍变方法

下面的例子显示了基本的ELISA方法在实际应用中的多样性。

i. 生物素-亲和素

这一检测系统是基于抗生物素蛋白（亲和素，avidin）与生物素（biotin）的高亲和力特性，以化学法将生物素偶联到抗血清的球蛋白部分，亲和素与用于测定的酶相结合。生物素的偶联不会干扰病毒抗体与病毒的结合能力，因此使用这种直接双抗夹心法可检测很大范围的病毒血清型，并能增加灵敏度（Zrein *et al.*，1986），还有速度快、用途多的优点（Hewish *et al.*，1986）。

ii. 荧光底物的应用

Torrance和Jones（1982）表示碱性磷酸酶的荧光底物（fluorogenic substrate）4-甲基-伞形酮酰基磷酸（4-methyl-umbelliferyl phosphate）用于ELISA比应用标准的具有发色团的底物灵敏度更高，但这一方法需要昂贵的读板仪器。Reichenbacher等（1984）发明了超微ELISA（ultra-micro ELISA），使用同样的具有荧光团的底物和测试体积为10 μl的微量板。时间分辨荧光免疫测定法（time-resolved fluoroimmunoassay）的建立通过降低背景而提高了灵敏度（Siitari and Kurppa，1987）。这种方法使用螯合铕（europium chelate），产生的荧光强，且半衰期长，因此，在其荧光衰退前，背景荧光已衰退。Sinijarv等（1988）利用这一方法使用MAb检测到了稀释7×10^4倍的马铃薯块茎提取液和稀释2×10^7倍的叶片提取液中浓度为5 pg/ml的PVX。

iii. 酶的级联放大

Torrance（1987）描述了一种增加ELISA灵敏度的方法，将酶结合于抗体，催化NADP生成NAD，NAD参与第二个酶介导的循环反应，产生红色的终产物。这种方法可用于快速诊断在植物中浓度很低的黄症病毒属的病毒，也可检测单一蚜虫介体体内的病毒。

iv. $F(ab')_2$和A蛋白-酶缀合物（conjngate）的应用

Barbara和Clark（1982）提出了一种简单的间接ELISA方法，病毒与结合于酶联板上的同源抗体的$F(ab')_2$片段相结合，结合了的病毒再与完整的抗病毒的免疫球蛋白反应。这样只需要一种病毒抗血清，通过A蛋白和酶的缀合物检测结合的免疫球蛋白。A蛋白只结合于完整的免疫球蛋白的Fc部分。这一方法已被有效地用于小果树木的几种病毒的检测（Converse and Martin，1982）。

v. 放射免疫ELISA

Ghabrial和Shepherd（1980）发明了一种简单的高灵敏度的放射免疫吸附测定法，利用微量板的直接双抗夹心法的原理，只是区别于用^{125}I标记的IgG取代ELISA中的酶联的IgG。在分析前先将结合并标记了的IgG从夹心中解离下来。

vi. 病毒在粗提液中特异活性的测定

Konate和Fritig（1983）将两种方法相结合用于测定体内放射性标记的病毒的特异活性。先应用间接双抗夹心ELISA估计每一孔内病毒的含量，再测定结合于孔内的病毒的放射性。

vii. 使用聚苯乙烯珠的ELISA

直径为6.5 mm的聚苯乙烯珠已被用于取代微量板作为固相介质（一个珠为一个测试）（Chen *et al.*，1982）。用这一方法检测SMV不同株系的差别比用标准的微量板的

方法更具有分辨力。

C. 样品的收集、制备和储存

和其他的诊断测试一样，有必要确定和优化取样时间和所取的组织，以获得可靠的常规检测结果（Torrance and Dolby，1984；Rowhani *et al.*，1985；Perez de San Romdn *et al.*，1988）。限制 ELISA 检测的样品数目的主要因素是组织提取液的制备。为降低这一问题的影响，已测试了多种方法（Mathon *et al.*，1987）。另一方面，至少对于某些病毒，可以通过剪取被测植株叶片，取几个小的叶盘，直接放到微量板的孔内（Romaine *et al.*，1981）。

如果测定成百上千种田间样品，通常有必要在进行 ELISA 之前，把它们保存起来。储存条件可能是获得可靠结果的关键。因此需针对每种病毒和寄主优化储存条件（Ward *et al.*，1987）。

D. 单克隆抗体

1. 使用单克隆抗体的测试

许多 MAb 不能用于沉淀反应，尤其是和蛋白抗原单体之间，因为蛋白抗原单体每个分子可能只含有一个抗体结合位点。但是，MAb 和抗 MAb 用于提取或沉淀只有单一抗原决定簇的一种多肽或蛋白抗原是很方便的。在检测和诊断方面，MAb 已非常普遍地和 ELISA 或放射性免疫测定相结合使用，但合适的条件，如 pH 及其他因素是至关重要的。因为根据使用的 ELISA 方法的不同所选择的 MAb 也会截然不同，所以在很多应用中，使用的 ELISA 程序最好和 MAb 分离过程中筛选 MAb 所使用的一样（van Regenmortel，1986）。如果 ELISA 测定中使用的 MAb 的浓度很高，可能会检测到不同属的病毒间的假的交叉反应。但是，使用牛奶蛋白而不是白蛋白作为封闭剂和稀释剂可以避免这种情况（Zimmermann and van Regenmortel，1989）。使用的 ELISA 方法不同，一种 MAb 和一定抗原的反应活性也会变化很大（Dekker *et al.*，1989）。

Diaco 等（1985）在生物素-亲和素 ELISA 中，使用了 MAb 检测大豆种子中的 SMV；Omura 等（1986）用 MAb 和乳胶凝集检测了植物和昆虫中的 RSV。Sherwood 等（1989）获得了在 ELISA 和点印迹反应中能和 TSWV（一种有脂蛋白包膜的病毒）的内核反应的 MAb。如果目的只是诊断的话，选择能和几种株系的共同抗原决定簇反应的 MAb 可能是更有用的，如 PVY（Gugerli and Fries，1983）、PVX（Torrance *et al.*，1986a）和 CTV（Vela *et al.*，1986）。或者，把几种株系或病毒特异的 MAb 混合使用（Dore *et al.*，1987a；Perez de San Romdn *et al.*，1988）。MAb 也可用于区分不同的株系，甚至可用于区分外壳蛋白只有单一氨基酸不同的不同分离物（Chen *et al.*，1997）。第 17 章第Ⅱ节 B.4 部分描述了使用一组 MAb 区别病毒株系的抗原决定簇类型。MAb 还可用于确定不同病毒间的亲缘关系（Seddas *et al.*，2000）。

2. 利用 MAb 的优点

i. 免疫的需要

小白鼠和大鼠可用少量的抗原免疫（约 100 μg 或更少）。如使用的病毒制品被寄主

成分或其他病毒污染，仍可能筛选出只和目的病毒反应的MAb。

ii. 标准化

MAb作为均一的试剂可以在不同的实验室应用，能够排除过去使用变化的多克隆抗体时引起的很多混乱，而且，在适合的条件下，可以获得几乎无限量的MAb。

iii. 特异性

MAb只和抗原的一个位点结合，因此，具有非常高的特异性，可以精巧地区分不同的病毒株系（参见第17章），也可用于研究病毒结构（参见第5章）和介体传播（参见第11章）。

iv. 高亲和力

检测MAb的筛选步骤使获得与抗原很高亲和力的抗体成为可能。高亲和力的抗体可在高稀释度下使用，这样就降低了测定中的背景影响。MAb还可通过亲和层析法用于病毒纯化。

v. 细胞的储存

将杂交瘤细胞储存于液氮中，可以长期作为生产MAb的细胞来源。

3. 应用MAb的缺点

a. 制备

制备多克隆抗体要相对容易些。新的MAb的分离非常费力，费时而且相对昂贵。对于任何特定的实验设计，都必须权衡这些现实问题和以上提到的MAb的优点。

b. 特异性

MAb的特异性很高，可能因此而不适用于某些应用，尤其是诊断方面，这是需要考虑的很重要的方面。

c. 对构型变化的敏感性

因为MAb的高特异性，所以对由于抗原与固相介质结合或测定中的其他条件而引起的抗原构型的改变很敏感。

4. 总结

虽然MAb是植物病毒研究很多方面的非常好的工具，但是，在所有应用中取代多克隆抗体是不可能的。对于检测和诊断，已有商品化的适当的MAb。

E. 噬菌体展示的单链抗体

关于噬菌体展示用于生产由免疫球蛋白的scFv区组成的抗体的理论与应用已在第Ⅳ节A.7部分中描述。这一技术已用来提供多种病毒的抗原决定簇特异的抗体，如BNYVV（Griep *et al.*, 1999; Uhde *et al.*, 2000）、PLRV（Harper *et al.*, 1999c; Toth *et al.*, 1999）和TSWV（Griep *et al.*, 2000）。一个噬菌体展示文库包含了能与CMV外壳蛋白结合的全部的随机九肽（Gough *et al.* 1999），这表明可以发现能和病毒结合的是蛋白质而不是抗体。

这一技术和杂交瘤生产MAb相比具有以下几个优点：①更为快速，制备一组抗体

只需几周而不是几个月的时间；②不需要使用动物；③不那么昂贵；④能够克服抗体制备过程中因蛋白质水解而丢失免疫的抗原决定簇问题，例如，用杂交瘤制备 BNYVV 的抗体时，因蛋白质水解很容易丢失 BNYVV CP 的重要的 C 端决定簇。噬菌体展示技术就可避免产生这一问题（Uhde *et al.*，2000）。

F. 血清学特异的电镜观察

Larson 等（1950）首次将电镜观察法和血清学方法相结合使用，Matthews（1957）也阐明了这一点。但在这一技术发展成为有效的、应用广泛的诊断手段之前，需要有负染技术的应用。Derrick（1973）描述了一种操作过程，首先用所研究的病毒的特异性抗体包被电镜铜网上的支持膜，接着将铜网浮在适当稀释度的病毒溶液上 1 h，然后冲洗，干燥，负染，最后镜检。在适宜条件下，用抗血清包被的铜网比用正常血清包被的能结合多得多的病毒粒体。因此，这一技术依据病毒的两种性质进行病毒的诊断：血清学反应活性和粒体的形态特性。许多年里，这一技术都没有得到普及，但目前，在适宜条件下已广泛用作一种诊断手段。有很多术语描述这一技术：血清学特异的电镜技术（serologically specific electron microscopy，SSEM）、免疫吸附电镜（immunosorbent electron microscopy，ISEM）技术固相免疫电镜（solid-phase immune electron microscopy）技术和电镜血清学。Milne（1991，1993）综述了这方面的内容。

1. 修饰技术

Milne 和 Luisoni（1977）把常规的方法进行了改进，而引入到植物病毒学研究中。先将病毒粒体吸附到电镜的铜网上，再用病毒特异性抗体包被，因此就很容易在负染的样品中看到病毒粒体周围产生 IgG 分子的光圈。这一现象称为修饰（decoration）。这一技术最方便于通过电镜技术展示病毒与 IgG 间的特异结合。测试很严格时，可在制备的样品内添加另一种没有血清学关系、形态相似的病毒（图 15.14）。

Milne（1984）、Milne 和 Lesemann（1984）及 Katz 和 Kohn（1984）描述了这一技术的详细操作过程，并讨论了操作的困难。一些病毒粒体经修饰后，可能会发生解离现象（Langenberg，1986b），但和莴苣巨脉病相关的不稳定的类似病毒的杆状粒体的测定就是使用这一技术，结果表明这种粒体和 TSTV 相关（Vetten *et al.*，1987）。

这种技术的主要优点是：①结果通常很清晰，能显示出特定形态的病毒粒体，因此假阳性结果很少；②检测有些病毒时，灵敏度可能和 ELISA 具有同等数量级，比通常的电镜观察法高出约 1000 倍（Roberts and Harrison，1979）；③当支持膜用抗体包被时，和铜网结合的寄主成分的背景少得多；④抗血清不需分馏或偶联即可应用，少量血清的结果也很好，因此只需少量的抗血清；⑤非常少的（大约为 1 μl）病毒抽提液就足够了；⑥存在能和寄主组分相结合的抗血清也不是问题，因为它们不能和病毒相结合；⑦一种抗血清可以检测一定范围的血清学的变种（另一方面，使用单克隆抗体可以极大地增加测试的特异性）（Diaco *et al.*，1986）；⑧30 min 内就可以得出结果；⑨使用修饰，铜网中存在的不相关的没有得到装饰的病毒粒体也容易检测到；⑩粒体中不同蛋白质都能被修饰［如长线病毒属（*Closterovirus*）和毛形病毒属（*Crinivirus*）中病毒的两种外壳蛋白；见图 5.12］；⑪可以把制备好的铜网送到距离远的实验室，在那里加上

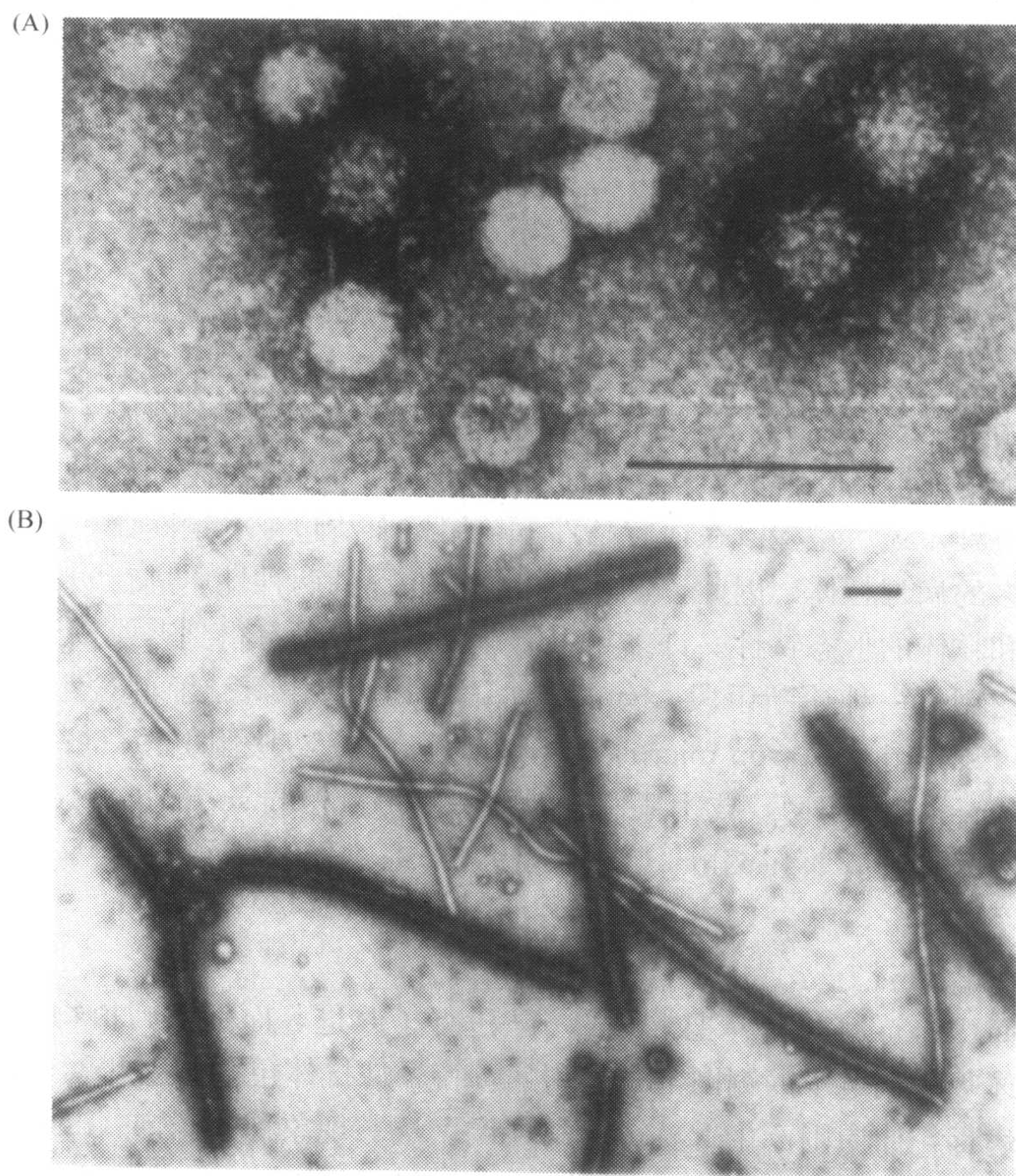


图 15.14 免疫电镜技术（ISEM）。（A）纯化的 TNV 和 TBSV 吸附于铜网后，用饱和的 TBSV 抗体处理而使 TBSV 粒子被装饰，TNV 粒子未被修饰而具有明显的边界轮廓。抗体分子出现在背景中。图中条线代表 100 nm。（B）混合侵染多年生葫芦（*Bryonia cretica*）植株的两种马铃薯 Y 病毒属的病毒。使用的抗血清只修饰其中的一种病毒。靠近中央的一个粒子比正常的粒子长些，且只有全长的一部分被装饰。这个粒子可能是两种病毒的粒子通过尾尾相连形成的。图中线条代表 100 nm。承蒙版权所有者（© Springer-Verlag GmbH and Co. KG）惠允，引自 Milne（1990）。

病毒提取物，再送回原实验室，进一步处理和镜检。

这一技术的一些缺点是：①不能检测到小到电镜不能分辨的病毒结构（如外壳蛋白单体）；②有时因为一些未知原因，得到的结果不一致或根本没有结果（Milne and Lesemann，1984）；③需要使用电镜这样贵重的仪器，而且需要熟练的技术，劳动强度也很大，因为这些原因，在大规模的常规测试时，无法和 ELISA 相比；④如要得到定量结果，粒体的计数很费力，而且每个铜网中粒体数目可能变化很大，需要有对照的铜网。

总之，在测试样品很多时，SSEM 和 ISEM 不能代替 ELISA。它们主要应用在：①测定一种未知病毒；②只有少数诊断样品测试时；③ELISA 结果不确定或不够灵敏，

需要直接的证实时（如 BSV 的检测，Lockhart，1986；Thottappilly *et al.*，1998）。

2. 免疫金标记

金颗粒的电子密度很高，可以在电镜铜网上显示任何它所附着的粒子的位置，A 蛋白能和金粒子形成相当稳定的复合体。这种复合体能用来定位铜网上和病毒外壳蛋白相结合的任何 IgG 分子。

van Lent 和 Verduin（1985，1986）制备了两种平均直径分别为 7 nm 和 16 nm 的金粒子。图 15.15（A）显示了这些粒子的大小与病毒粒体及反应的特异性的关系。

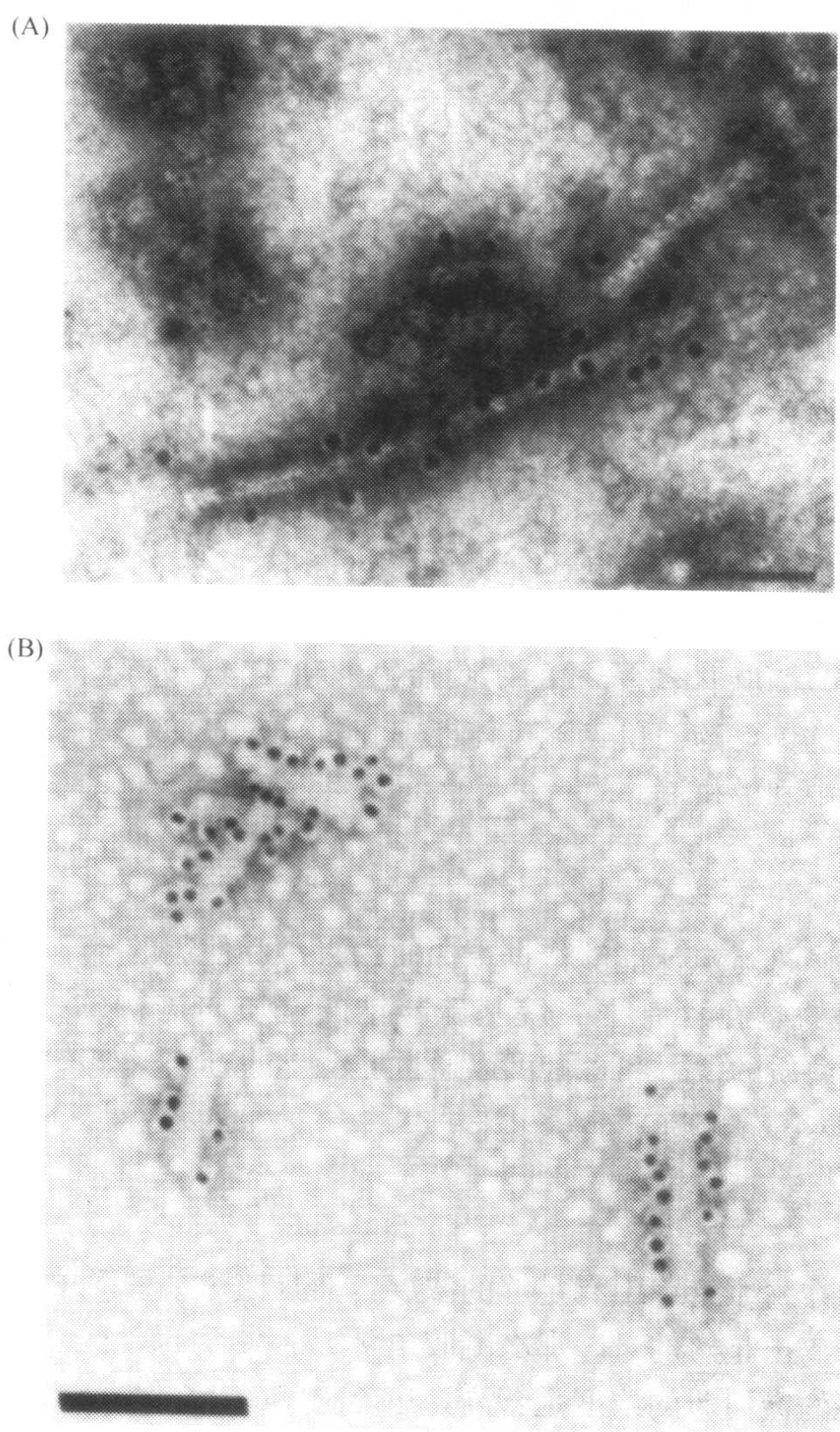


图 15.15　金标记的病毒粒体。（A）金标记的 A 蛋白及靠近病毒表面的病毒特异的 IgG。病毒粒体由 A 蛋白和金的复合体所标记。7 nm A 蛋白-金标记的纯化的 CCMV 和 16 nm A 蛋白-金标记的 TMV 的混合物。图中条线代表 100 nm。引自 van Lent 和 Verduin（1986）。（B）先用抗 RTBV 蛋白酶的兔抗血清处理，再用金标记的羊抗兔的抗血清处理的 RTBV 粒子。图中线条代表 200 nm。承蒙惠允，引自 Hay 等（1994）。

免疫金标记对于受侵染细胞的超薄切片中病毒抗原的定位尤为重要（图 8.24）。van Lent 和 Verduin 发现金粒子越大越容易在染色的超薄切片中看到。这一方法已被应用到使用光学显微镜定位病毒抗原（van Lent and Verduin，1987）。Patterson 和 Verduin（1987）对此进行了综述。

G. 荧光抗体

荧光抗体方法主要应用在寄主植物组织或昆虫介体体内的植物病毒细胞内定位和分布的研究中。Nagaraj（1965）给出了结合荧光素的制备和储存中必须进行的详细操作，以避免非特异的染色。实验中有必要设置适当的对照。荧光抗体染色尤其适用于检测分离的受侵染的原生质体的病毒抗原（Otsuki and Takebe，1969）。Chiu 和 Black（1969）及其他人成功地使用了标准的荧光抗体方法对昆虫介体中的病毒抗原进行了检测。

H. 侵染性的中和

病毒与特异的抗血清混合比与非免疫血清混合侵染性下降的程度大。使用高稀释度血清时，病毒只有和特异的抗血清混合时会发生钝化（Rappaport and Siegel，1955）。这一现象在植物病毒学中几乎没有得到应用，主要是因为侵染性测定缺乏准确性。中和试验（neutralization test）已被用来显示不能机械传播的病毒间的血清学关系（Rochow and Duffus，1978）。对于足够稳定的病毒如 TMV，低 pH 条件下可去除抗体，病毒的侵染性还能恢复。中和的机制还不明确。IgG 和病毒蛋白的结合可能妨碍了病毒核酸从外壳蛋白内有效释放，或者可能阻碍了病毒在侵染早期附着到细胞内的某个位点上。Dietzgen（1986）利用化学合成的四肽筛选出和 TMV 外壳蛋白的 C 端抗原决定簇特异结合的单克隆抗体，这一单克隆抗体能中和 TMV 的侵染性。利用这一方法进行系统研究可能会揭示中和的机制。

I. 电泳方法

在适当的基质中进行电泳能够依据蛋白质的大小和使用的 pH 条件下的净电荷而将其分离。通常使用的是在含有十二烷基硫酸钠的基质内进行的聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）。蛋白质的位置和含量可以通过非特异的方法（如染色法）或特异的方法（如免疫测定）（Western 印迹）显示出来。

1. 利用染色法的凝胶电泳

如果一种病毒在寄主组织中有足够的浓度，而且通过某种简单的预处理就可以从干扰的寄主蛋白中分离出足够的量，那么凝胶电泳是检测病毒外壳蛋白的一种快速方法。如果其他病毒编码的蛋白质的浓度足够高，也能检测到。

2. 利用电印迹免疫测定的电泳

O'Donnell 等（1982）及 Rybicki 和 Vonwechmar（1982）首次将凝胶电泳分离蛋白质的能力和固相免疫测定的灵敏性及特异性相结合用于病毒蛋白的检测分析。这一方法的主要步骤是：①SDS-PAGE 分离受侵染植物汁液中的蛋白质；②电转移蛋白质带；

③使用牛血清白蛋白或脱脂奶粉封闭膜上的未结合位点；④特异性抗血清探测病毒外壳蛋白带；⑤应用^{125}I标记的蛋白 A ELISA 检测抗原-抗体复合物。这一方法的最大优点是它依据病毒外壳蛋白的两个独立的性质，即分子质量和血清学特异性来测定病毒。Shukla 等（1983）发现氨基苯基硫醚（APF）纸比硝酸纤维素膜更能有效的结合病毒外壳蛋白。与考马斯亮蓝染色能检测到 500 ng 病毒外壳蛋白相比，它能检测到 0.5 ng。而且 APF 纸能与蛋白质稳定结合，所以一张纸在去掉结合的抗体蛋白后还可以接着再用一定量的抗血清探测。完整的病毒粒体先进行琼脂糖凝胶电泳，再通过扩散印迹将病毒粒体转移到纸上，然后可进行电印迹免疫测定（Koenig and Burgermeister，1986）。

正如第Ⅲ节 A.2 部分指出的，通过凝胶电泳可以分离病毒粒体。非变性电泳和 Western 印迹分析（native electrophoresis and Western blot analysis，NEWeB）即在琼脂糖或丙烯酰胺与琼脂糖混合的凝胶中直接用含有 PPV 粒体的植物提取液电泳，再压印到硝酸纤维素膜上（Manoussopoulos *et al.*，2000）。通过免疫探测法（immunoprobing）确定病毒粒体的位置，可以区分出复合侵染的两种不同的 PPV 株系。

第Ⅴ节　基于核酸特异性的方法

一种病毒核酸的总的特性，如是 DNA 或 RNA、双链还是单链、一条链还是多条链，是将一种病毒归类到特定的科或属的基础。但是除了双链 RNA，通常这些特性对常规诊断、检测或鉴定几乎起不到什么作用。克隆植物病毒全部或部分 RNA 基因组的 cDNA 的能力已为此提供了许多新的可能性。DNA 拷贝的核苷酸序列可以测定，但除非在特殊的情况下，否则用这种方法诊断太费时了。基本上，依据核酸特异性进行病毒的检测和诊断有以下 4 个方面：

（1）与病毒粒体结合的核酸的类型和分子大小；

（2）病毒 DNA 或 cDNA 的切割模式；

（3）核酸间的杂交；

（4）聚合酶链反应（PCR）。

在这部分里，将讨论这些方法的原理和应用。

A. 核酸的类型和大小

如上所述，和 RNA 病毒侵染相联系的双链 RNA 的特性已被用于病毒诊断（Dodds，1993）。

双链 RNA 以下述两种方式与植物 RNA 病毒相关：①植物呼肠病毒（plant reoviruses）（第 6 章第Ⅵ节）和隐潜病毒（cryptoviruses）的病毒基因组是由双链 RNA 组成的；②单链 RNA 病毒侵染的植物组织内病毒基因组 RNA 的双链形式，大小为基因组 RNA 的 2 倍，称为复制型（图 8.6）。根据 PAGE 中双链形式的特征或使用和双链 RNA 反应的抗体，可将这些复制型的双链 RNA 用于病毒诊断。

a. 分离双链 RNA 的电泳

Dodds 等（1984）和 Dodds（1993）总结了从被侵染组织中分离双链 RNA 和使用适当的分子质量标记进行双链 RNA 的 PAGE 或琼脂糖凝胶电泳的分离、测定方法。通

常使用溴化乙锭或杂交显示出双链 RNA 的带（Bar-Joseph *et al*.，1986）。也可把凝胶中的双链 RNA 洗脱出来，用以制备点印迹分析中使用的放射性标记的探针。

原理上，每种 RNA 病毒都能产生独特的双链 RNA 带。现已发现一些病毒属的病毒，如有些单分体基因组的杆状病毒就是这样（Valverde *et al*.，1986）。但是，几乎总是同时存在比全长双链 RNA 小的双链 RNA 分子。这些较小的病毒特异的 RNA 的带型具有病毒特征性。有时根据较小的 RNA 的带型可以区别同一种病毒的不同株系。

因为有些没有接种的和明显健康的植株也含有一些双链 RNA 种类，所以双链 RNA 在诊断中的应用变得很复杂。例如，Nameth 和 Dodds（1985）发现温室内生长的没有接种的 50 个南瓜品种中有 40 个含有容易检测到的分子质量为 $0.5\times10^6\sim11.0\times10^6$ Da 的双链 RNA。每个品种有其特征性的双链 RNA 带型，证明其种传特性。这些双链 RNA 的本质还不确定，但就最大的双链 RNA 的种类的高分子质量特性来看，它们可能和还没有被描述过的潜隐病毒有关。另一方面，Wakarchuk 和 Hamilton 描述了从菜豆（*Phaseolus vulgaris*）的一个变种中分离到的高分子质量的双链 RNA，这些双链 RNA 的序列和它们所在的菜豆变种及不含有能检测到的双链 RNA 的其他菜豆变种的基因组 DNA 的序列相似。第 17 章中指出了其他一些从几种植物中分离到的大的双链 RNA 种类。双链 RNA 的另一种可能来源是被检测植株上偶然存在的真菌。许多真菌病毒具有双链 RNA 基因组，也有的双链 RNA 分子和植物病原真菌有关（Nuss and Koltin，1990）。

尽管存在这些问题，双链 RNA 方法对一些寄主植物的病毒病诊断仍很重要。用这一方法可以很容易检测到受侵染的悬钩子属（*Rubus* spp.）植物中的 TRSV、RBDV 和悬钩子叶斑病毒。田间的病株样品中常常含有两种或两种以上病毒，利用双链 RNA 的带型可以很容易测定出来（Martin，1986）。这一方法可以替代嫁接或蚜传到指示植物上的测定方法。同样，如果用于取样的寄主植物组织处于适宜条件下，双链 RNA 法对各个柑橘种植株中 CTV 及其株系的诊断也很有效（Dodds *et al*.，1987）。与花生丛矮病相关的一种低分子质量的双链 RNA 已被用作一种诊断工具（Breyel *et al*.，1988）。

b. 双链 RNA 的抗体

在制备的植物呼肠病毒的抗血清中发现了和双链 RNA 非特异性反应的抗体（Ikegami and Francki，1973；van der Lubbe *et al*.，1979）。利用合成的 poly（I）：poly（C）作抗原可以制备出这种非特异性抗血清（Sollar，1975），但这种方法还没有广泛地应用到植物病毒学中。识别双链 RNA 的 MAb 已制备出来，并用于检测 18 种病毒侵染的植物提取液中这种形式的 RNA 的免疫印迹中（Lukacs，1994）。免疫印迹分析和温度梯度电泳相结合可以区分 BCV-1 和 BCV-2 的双链 RNA 基因组。因为双链 RNA 的 MAb 不能和小于 11 bp 的双链序列反应，所以可以用作探针，测定核酸提取液中 RNA 的结构（Schonborn *et al*.，1991）。

c. 异源双链 RNA 的多态性

单链和双链核酸在凝胶中的电泳迁移率不同，可作为诊断的依据。单链构象多态性技术（single-stranded conformation polymorphism，SSCP）最初就是基于不同一级结构和三级结构的单链 DNA 具有不同的迁移率（Orita *et al*.，1989a）。如第 17 章描述的将 SSCP 应用于 BNYVV 的单链 RNA，目的是区分不同的株系（Koenig，1995），但事

实证明利用这一方法检测突变体时结果不一致。但通过改变这种方法，使用异源双链（heteroduplex）RNA 转录本的多态性可用来检测 PNRSV 的不同株系（Rosner *et al.*，1998；1999）。

B. DNA 的切割图谱

使用限制性内切核酸酶在特定位点切割 RNA 基因组的 cDNA 和 DNA 病毒的基因组，再通过 PAGE 确定片段的大小，可用于区分特定的属内的不同病毒。例如，Hull（1980）表示 CaMV 的不同分离物可依据限制酶切割病毒 DNA 的模式加以区分（后来称为限制性长度多态性绘图；RFLP）。但是，针对同一病毒的多次实验的结果存在相当大的变异（参见第 17 章），对于同一次制备的病毒样品的不同 RTBV DNA 克隆的 RFLP，其结果也存在很大的变异（Villegas *et al.*，1997）。Haber 等（1987）用双生病毒属内一种病毒的标记 DNA 作探针，与经 PAGE 分离的限制性内切核酸酶切割的片段杂交，测定一系列属内病毒，每种病毒都有其特征性的带型。Kruse 等（1994）给出了一个应用 RFLP 分析一种 RNA 病毒的 cDNA 的例子。他使用这一技术区分了 BNYVV 的两个不同株系。

这一技术在特定条件下可能是有用的，但还没有在植物病毒学中得到广泛的认可。

C. 杂交技术

杂交技术的理论依据是极性相反且核苷酸序列足够相似的单链核酸分子能杂交形成双链分子。最初发展杂交技术的动机是来自对类病毒的研究，因为类病毒不含有蛋白质，所以这一技术可以用于类病毒的诊断（Palukantis *et al.*，1981；Allen and Dale，1981）。

1. 杂交技术的基础

核酸杂交的理论很复杂，Brirren 等（1974）和 Hull（1993，2000）对此进行了讨论。Watson 和 Crick 提出的双链 DNA 的结构模型表明双链 DNA 的两条链是通过特定互补的碱基，也就是腺嘌呤和胸腺嘧啶，鸟嘌呤和胞嘧啶间的氢键结合在一起。碱基配对的相互作用是所有核酸分子杂交的基础。早期的研究显示了这一过程的几个重要特征。使用各种物理的和化学的方法能够先打破碱基的配对而使两条链分开（称为核酸的熔解或变性），再使碱基重新配对而将双链核酸复性（称为杂交）。通过这种方法能够测定控制双链复合体稳定性的各种因素。这些基础研究大多是利用溶液中目的 DNA 和探针 DNA 间的液-液相杂交实现的；也有一些研究是关于溶液中 RNA：RNA 和 DNA：RNA 的相互作用。虽然，目前大多植物病原诊断涉及的是将目的核酸固定在固相介质上的混合相杂交，但和液-液相杂交技术发展的理论基础仍密切相关。

以下总的论述了杂交实验中必须考虑的一些主要因素。在 Ausubel 等（1998）、Britten 等（1974）、Britten 和 Dnridson（1985）及 Young 和 Arderson（1985）的论文中详细论述了关于杂交理论的内容。

a. 变性

有多种因素影响到变性。

i. 温度

高温下双链核酸能够变性。链分离发生的温度范围相对较窄，50%的序列发生变性的温度称为熔解温度（T_m）。影响 T_m 的主要因素有核酸的组成、溶液的浓度和 pH，以及某些能破坏氢键结合的物质，如甲酰胺。

ii. 核酸的组成

鸟嘌呤+胞嘧啶（G+C）碱基对有 3 个氢键，腺嘌呤+胸腺嘧啶（A+T）碱基对有 2 个氢键，前者比后者更稳定。对于 1×SSC 溶液中完全配对的 DNA（SSC=0.15 mol/L 氯化钠，0.015 mol/L 柠檬酸钠），T_m 和（G+C）含量的关系为：

$$T_m = 0.41(\%G+C)+69.3$$

iii. 盐

盐浓度对某一双链复合体的 T_m 影响很大。在 0.01～0.1 mol/L 范围内，单价阳离子的浓度每增加 10 倍，T_m 将增加 16℃。在较低的浓度范围内，T_m 可由下面的公式计算得出：

$$T_m = (\%GC/2.44)+81.5+16.6\log M$$

式中，M 为单价阳离子的摩尔浓度。

二价阳离子浓度的影响作用更大，需使用 EDTA 等螯合剂将其除去。

iv. pH

pH 在 5～9 范围内，T_m 对其不敏感。pH 在 5 以下，就会发生脱嘌呤反应，pH 越低，脱嘌呤反应越快。因为去嘌呤核苷酸具有碱稳定性，所以可以应用这一特性造成 DNA 切口。pH 在 9 以上，双链核酸开始变性，先在富含 A+T 的区域。大多双链 DNA 分子在 pH 为 12 时能完全变性。RNA 的磷酸二酯键在 pH 大于 8 时就会发生断裂，pH 和温度越高，变性作用就越快。

v. 有机溶剂

一些有机溶剂如甲酰胺、二甲基甲酰胺、二甲亚砜以及尿素等能降低 T_m 值。如每 1%甲酰胺可使 T_m 值降低 0.7℃。

vi. 碱基错配

碱基错配的序列比完全配对的稳定性低。长于 100 bp 的核酸，1%的碱基错配可使 T_m 值降低约 1℃。因此，通过改变杂交条件可以估计碱基错配情况（见下面有关严紧性的论述）。

vii. RNA：RNA 和 RNA：DNA 双链体

双链 RNA 的 T_m 值明显高于双链 DNA 的 T_m 值。在 1×SSC 溶液中，DNA 的 T_m 值一般约为 85℃，而 RNA 的 T_m 值近乎 100℃。

在相同的条件下，RNA：DNA 杂交分子的 T_m 值比 DNA：DNA 杂交复合体的 T_m 值高出 4～5℃。

b. 复性

与复性相关的主要两点是复性发生的速度和产物的稳定性。影响产物稳定性的因素和控制变性的因素相同。影响复性速率的主要因素如下：

i. 温度

典型的 DNA：DNA 复性反应，复合体形成的速率对温度的曲线为宽谱曲线，最大

速率在比 T_m 值低约 25℃处，这一温度为复性的最适温度。比最适温度低得多的温度可有效地使复性停止。因此，可以通过高温熔解双链复合体，然后迅速降低温度（把试管插到冰内）至比 T_m 值低得多的温度，可使其相当长的一段时间内处于单链状态（称为淬火，quenching）。如果降低 T_m，如使用甲酸，最适的复性速率在新的 T_m 25℃处。但因温度较低，总的杂交速率将比没有甲酸时更低。

ii. 盐浓度

单价阳离子的浓度能显著地影响复性的速率，0.1 mol/L 以下的氯化钠，盐浓度每增加 2 倍，复性速率增加 5～10 倍或更多。随着盐浓度的增加，复性速率仍继续增加，但氯化钠在 1.2 mol/L 以上时，复性速率恒定。二价阳离子对复性速率的影响非常显著，需使用螯合剂（如 EDTA）将其除去。

iii. 碱基错配

碱基配对的准确性也会影响到复性速率。复性反应在最适条件（如 T_m 为 25℃）下，每 10%的碱基错配，复性速率就会降低一半。

iv. 片段长度

具有相同长度的 cDNA 链，复性速率随长度的平方根的增加而增加。链长度不同时，复性速率取决于哪条链过量，解释起来非常复杂。

v. 核酸浓度

复合体形成所需时间直接和相互作用的单链分子的起始浓度成比例。通常以一定的核酸起始浓度（C^0：每升溶液内核苷酸的摩尔数）和反应时间（t：以秒为单位）的产物来测定不同的复性反应（C^0t：每秒每升的摩尔数）。C^0t 的值在液-液相杂交中确定一些特性如核酸的不同序列（复杂性）和重复序列的数量时非常有用。

vi. 多聚体

阴离子多聚体、硫酸葡聚糖（dextran sulfate）能加速溶液中或滤膜上进行的复性反应。10%的硫酸葡聚糖溶液（分子质量为 500 000 Da）能提高溶液中进行的复性反应的速率约 10 倍，提高固定核酸杂交的速率高达 100 倍。一般认为其原因是能使核酸从多聚体中解离出来而有效地增加了核酸浓度。

vii. RNA-DNA 杂交

影响 RNA 和 cDNA 杂交的因素与影响 DNA∶DNA 相互作用的因素有些不同，也许是因为 RNA 中有更多的很强的二级结构。如果在中等盐浓度条件下（0.18 mol/L 氯化钠），RNA 过量，RNA 和 cDNA 杂交的速率几乎和 DNA∶DNA 杂交速率一样。但是，随着盐浓度的增加，其速率的增加没有 DNA∶DNA 杂交速率增加的快。如 DNA 过量，杂交速率要比预期的 DNA∶DNA 复性速率低 4～5 倍。

c. 混合相杂交

混合相杂交的动力学的研究不如液-液相杂交的研究深入。通常认为，反应条件对滤膜杂交的影响在质的方面及多数情况下在量的方面都与其对液-液相杂交的影响一样（Anderson and Young，1985）。但根据使用双链探针进行的滤膜杂交的普遍经验，如果要研究其动力学的话，探针的双链性可能有很重要的影响。

i. 探针双链性

滤膜杂交中使用双链探针时，有两种杂交方式发生：探针与被固定的目的序列间的

杂交和探针的自我退火。后者能引起两种效应：缺少有效探针而因此降低灵敏度及连接体的形成，连接体可能再和目的核酸杂交，这样会增加灵敏度但降低特异性。为降低这两种效应，探针内与目的核酸互补的序列应相对短些，在少量的反应体积内，探针的浓度应低些，且反应应在尽可能高的温度下进行。

单链探针能在很大程度上克服这些问题，但^{32}P标记的单链探针浓度高于100 ng/ml时，探针可能会和膜非特异性结合。

ii. 探针长度

短的寡聚核苷酸探针（少于 30 bp），T_m 值可由下式估计：

$$T_m = 2(A+T)+4(G+C)$$

式中，A、T 和 G、C 分别为腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤和胞嘧啶碱基的数目。

对于滤膜杂交，解离温度 T_d 可由下式计算：

$$T_d = T_m - k$$

式中，常数 k 的经验值为 7.6℃。

长于 50 bp 的 DNA 的 T_m 可由下式计算：

$T_m = 81.5 + 16.6 \times \log[Na] + 0.41 \times (\%G+C) - 675/长度 - 0.65 \times (\%甲酰胺)$

iii. 严紧性（stringency）(Anderson and Young，1985；Meinkoth and Wahl，1984)

名词“严紧性”通常使用不当。它是与杂交条件和（或）冲洗条件对可能不完全配对的互补核酸间相互作用的影响相关联。不同严紧性的使用是杂交技术中较有力的工具之一。

滤膜杂交可用来确定序列间的相关程度。为此，必须能近似地估计杂交体内不配对的比例。这可通过调整反应条件直到能测定到期望的相互作用来实现。如果要将相互关系很近的核酸与很远的区别开，需使用较严紧的条件；如要检测到相互关系较远的核酸，条件的严紧性应低些。在整个操作过程中的两个阶段，杂交时和杂交后的冲洗，可改变严紧性。总的原则是关系远的序列，杂交条件应宽松，冲洗时增加严紧性；关系近的序列，杂交和冲洗都在严紧条件下进行。改变温度和（或）盐浓度和（或）甲酸浓度能改变严紧性。

确定核酸间关系的实验中还应考虑的是确定探针和目的核酸的相对浓度及探针大小。探针不应过量，以保证它不能饱和目的核酸。长于 100 bp 的探针，DNA 杂交体每10％的错配就能使 T_m 值下降 1℃；小于 20 bp 的杂交体，每个错配碱基能使 T_m 值降低约 5℃。

作为参照，以下是对于长于 200 bp、G+C 含量为 40％～50％的核酸的各种不同严紧性的条件：

低严紧性	50℃	5×SSC	允许近 25％错配
严紧	65℃	2×SSC	允许近 10％错配
高严紧性	65℃	0.1×SSC	允许<1％错配

d. 杂交形式的类型

液-液相杂交已被用于测定植物病毒间的相互关系。基本过程是放射性标记（见下面）的探针和目标核酸杂交，接着消化掉没有杂交上的单链探针，然后将双链杂交体沉

淀到滤膜上，最后测定放射性强度。

目前多数用于植物病原诊断的核酸杂交的方法都涉及混合相杂交的使用。有几种膜可利用，最普遍的是硝酸纤维素膜和尼龙膜。硝酸纤维素膜被广泛应用，但它主要有两方面缺陷，因为核酸是通过疏水键而不是共价键与膜结合，所以在杂交和冲洗的过程中能慢慢地和膜脱离；另外，干燥后，膜变得很脆，如希望将已结合的探针脱去，重新加探针杂交时，膜易损坏。尼龙膜能不可逆地和核酸结合，由于尼龙膜有更强的伸缩性，可以重复使用，较少有破裂问题发生，核酸可以在低离子强度的缓冲液中固定到尼龙膜上。尼龙膜的主要缺点是杂交背景较高，尤其是在以 RNA 为探针及使用一些非放射性报道系统（见下文）的情况下。尼龙膜有两种基本类型：未修饰的和电荷修饰的。后者表面有正电荷，与核酸的结合能力更强。有很多种品牌的尼龙膜，在性能细节方面有所不同（Khandjian，1987；Twomey and Krawetz，1990）。

如上面提到的，核酸只有在变性后才能结合在膜上。核酸的变性可通过碱处理（注意：碱处理会降解 RNA）、先加热再淬火或甲酰胺、甲醛、乙二胺处理。后两种化合物和核酸组成复合体，会抑制杂交。因此，需经温和的碱处理去除这两种化合物。Sambrook 等（1989）给出了各种变性处理的详细过程。

核酸转移到硝酸纤维素膜或尼龙膜上以后，需使其固定在膜上。这可通过 80℃ 真空烘干 0.5～2 h，或经紫外线照射（254 nm）。最简单的形式是点印迹（dot blot），将目的样品点到膜上，可直接点到膜上或用一个放在膜上的模具，样品放到模具上的一块塑料板的孔内或狭缝内（狭缝印迹）。更复杂的是，模具整合在一个装置上，能够透过膜抽吸样品，使其点到膜上，这种装置可以使样品在点到膜上的过程中得到浓缩。

点印迹不能确定目的核酸的种类和大小。如使核酸经凝胶电泳后再转移到膜上，就能够知道这些情况。Sambrook 等（1989）介绍了转移 DNA（Southern 印迹）和 RNA（Northern 印迹）的详细操作过程。还有一些其他的杂交形式也曾被描述过。很有应用前景的一种方法是夹心杂交（Ranki *et al.*，1983）。使用的是和目的核酸序列的相邻部分分别互补的两个核酸序列：一个称为捕捉序列（capture sequence），固定在固相介质上，与目的核酸杂交；另一个称为探针，也与目的核酸杂交（液-液相杂交）。在这一方法的改进方法中（Syvanen *et al.*，1986），捕获链经过修饰，如硫化或与一种蛋白质结合。捕获链和探针链与目的核酸的杂交在液相中完成。杂交体再与微量板的样品孔内捕获链的修饰分子的抗体相结合。由于这一方法至少不止一部分涉及液-液相杂交，所以相对来说夹心杂交更快速，且能够洗去提取液中的污染性物质，在改进的方法中，能使用 ELISA 技术及其设备。

2. 点印迹杂交

点印迹杂交是目前使用最普遍的大样本的检测方法。主要步骤是：①提取少量的待测植株汁液；②热处理使病毒核酸变性，如果为 DNA 病毒，使用碱处理法；③点一滴提取液于膜上；④烤膜或紫外灯照射使核酸固定在膜上；⑤将膜浸在含有一种蛋白质，通常为牛血清白蛋白或脱脂奶粉（Johnson *et al.*，1984），及不相关的单链 DNA 小片段和盐等的预杂交液中温育，封闭膜上的非特异结合位点；⑥标记的核酸探针和结合在膜上的核酸杂交；⑦洗去过剩的没有杂交的探针及通过适合于探针标记种类的方法测定

结合的探针的量。预杂交步骤（约 2 h）和杂交步骤（过夜）通常在约 65℃水浴中的可热封的塑料袋里或专门的装置内进行。Hull（1983）与 Dijkstra 和 de Jager（1998）给出了详细的操作步骤。

Owens 和 Diener（1984）与 Hull（1985，1986）给出了使用标记的核酸探针的印迹方法的技术细节。目前，这一方法广泛用于植物病毒学研究中。例如，一种点印迹杂交技术已成功地用于马铃薯对几种病毒的抗性育种中大量植株的筛选（Boulton *et al.*，1986）。已发展起来一种使用尽可能少的装置的非放射性点印迹系统，用于一些虫传病毒的常规诊断（Harper and Creamer，1995）。这种方法已被用来评价番茄丛矮病毒属（*Tombusvirus*）内病毒间的相互关系，但发现了一些不期望的交叉杂交（Koenig *et al.*，1988a）。还有一种灵敏的非放射性的方法已发展用来检测茎尖培养的植株中的 BaMV 和与它相关的卫星 RNA（Hsu *et al.*，2000）。

3. 组织印迹杂交

在上面的第Ⅳ节 B. 4. d 部分描述了组织印迹的免疫探测。组织的印迹能和标记的探针杂交。Guilfoyle 等（1993）描述了使用 ^{32}P标记的探针进行组织印迹杂交的方法。Mas 和 Pallas（1995）表示，虽然具有生色团的报道系统的非放射性探针比化学发光的报道系统的非放射性探针灵敏度低，但能显示出解剖学上的特征（参见第Ⅴ节 C. 5 部分）。

因为类病毒不含有可免疫检测到的蛋白质，所以组织印迹杂交对类病毒检测尤其有用，印迹膜的分子杂交已用于类病毒的检测（Podleckis *et al.*，1993；Romero-Durbán *et al.*，1995；Duran-Vila *et al.*，1996；Palacio-Bielsa *et al.*，1999）。

Boulton 和 Markham（1986）利用一种改进的方法，他们称为挤压印迹（或重拍印迹），检测了直接挤压在硝酸纤维素膜上的单个叶蝉介体体内的 MSV。使用的探针是 ^{32}P标记的，通过放射性自显影确定杂交程度。图 15. 16 展示了这一方法。

4. 原位杂交

原位杂交（*in situ* hybridization）能给出有关目的核酸在一个细胞内分布的信息。BSV 整合到香蕉染色体上的位点就是通过原位杂交确定的（Harper *et al.*，1999c）。纤维伸展杂交（fiber stretch hybridization）（Fransz *et al.*，1996；Brandes *et al.*，1997）是这一方法的延伸。杂交前，先使变性的染色体 DNA 展开在载玻片上，因此能确定整合位点的细致结构。第 8 章（第Ⅸ节 B. 4）对此进行了描述。使用原位 PCR 可使其灵敏度增加（Muro Cacho，1999）。

5. 探针的制备和标记

探针是指和目的序列互补且有一个能显示发生杂交的报道系统与之结合的一段序列。有时标记的病毒 RNA 被用作探针，且已显示出有几个优点（Lakshman *et al.*，1986），但在多数实验中无论是 DNA 病毒还是 RNA 病毒，使用的都是 DNA 探针。但 RNA 探针具有和目的核酸形成更强的复合体的优势，尤其是目的核酸是 RNA 时，更为灵敏。检测的灵敏度可能和探针的大小有关，较大的探针灵敏度也高（Barbara

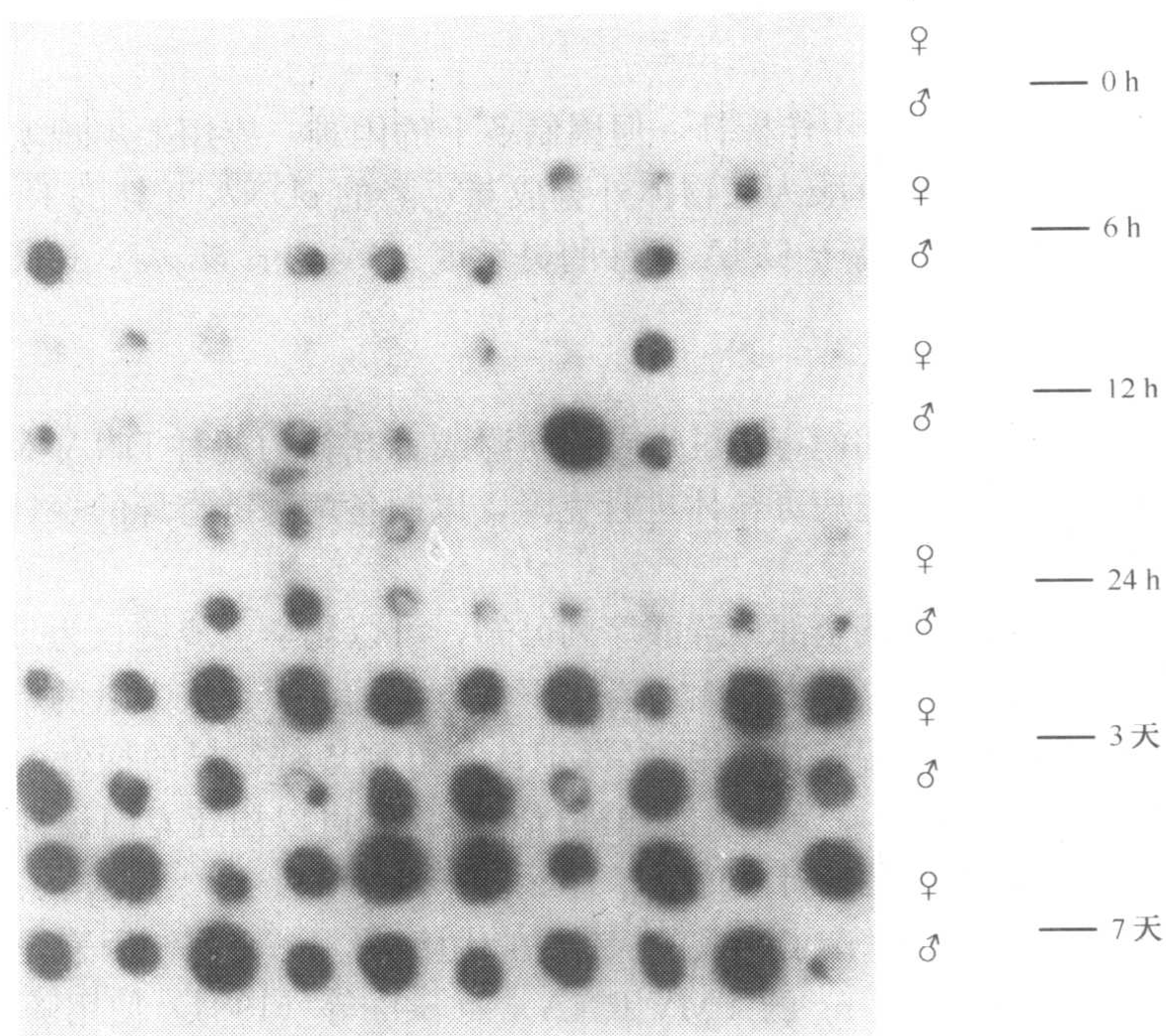


图 15.16 挤压印迹核酸杂交技术在估测叶蝉介体携带 MSV 的所需时间方面的应用。雄蝉（♂）和雌蝉（♀）的挤压印迹（squash blot）的放射性自显影图表明其携带 MSV 的时间过程。每一点来自一只叶蝉。承蒙惠允，引自 Boulton 和 Markham（1986）。

et al.，1987）。

如果能够知道病毒基因组的一段序列的相似程度可以区分同属内的不同病毒及同一病毒的不同株系，就可以根据这段序列制备诊断的 cDNA 探针用于测定（参见第 17 章第Ⅱ节 A 部分）。探针可用放射性标记（通常标记全部核酸结合在纸上的用 ^{32}P，细胞学实验用 ^{3}H），也可用非放射性标记，有多种方法可用于制备放射性或非放射性标记的探针。

a. 反转录

首先使用随机的短的 DNA 寡聚物作为引物，利用反转录病毒的反转录酶合成病毒 RNA 的 DNA 拷贝，新形成的链和病毒 RNA 互补（称为 DNA 拷贝 或 cDNA）。如果反转录过程中将放射性或非放射性的标记的核苷酸整合到新合成的链中，则新链可直接用作探针。

b. 克隆的探针

较普遍使用的方法是，先合成双链 cDNA，再插入到合适的细菌质粒中，使其在细菌中增殖。这一方法的实际应用及理论可分别参见 Sombrook 等（1989）以及 Old 和 Primrose（1989）的著作。这种方法可长期供应一种标准探针。每次所需要的探针再经切口平移（nick translation，一种酶促反应，从 dsDNA 中切掉一些核苷酸，切口再由核苷酸补上，其中一些核苷酸是被标记的）进行标记；或者使 dsDNA 经热处理变为单链，接着使用短的合成的寡聚物与之随机配对，利用 DNA 聚合酶和部分标记的核苷酸

进行新的双链分子的合成。

c. RNA 探针

尽管理论上 dsRNA 可以用作探针，但因制备上的困难，应用上不现实。较常使用的方法是利用部分标记的核苷酸为底物体外合成与克隆的 cDNA 互补的 RNA。这种方法制备的探针的灵敏度显著高于 DNA 探针的灵敏度（Varveri *et al.*，1988；Robinson and Romero，1991）。

d. 链特异的探针

有些实验，有必要制备和病毒 RNA 或者同源或者互补的两种 DNA 探针。可使用噬菌体 M13 把 ssDNA 包装进病毒粒体进行克隆，以制备两种链特异的探针。

e. 人工合成探针

如果病毒基因组的部分或全部核苷酸序列已知，可以化学合成链长为 15～20 bp 的寡聚核苷酸片段。理论上，这种方法至少有以下优点：①可以合成大量的单链探针，容易通过多聚核苷酸激酶将末端核苷酸用 ^{32}P 标记；②可制备链特异的探针；③几个15～20 bp 长的寡聚体可以先后串联及如上所述进行克隆；④可以构建专门设计的用于检测病毒基因组的一些特定部分的探针文库。

Bar-Joseph 等（1986）讨论了合成的探针的应用细节。一个限制因素是灵敏度。他们使用合成的探针可以检测 4 ng 的 TMV RNA，而 Sela 等（1984）使用随机的 ^{32}P标记的 TMV cDNA 能检测到 25 pg 的 TMVRNA。

f. PCR 探针

聚合酶链反应（PCR）在第Ⅴ节 D 部分讨论。

g. 非放射性探针

很多研究人员在寻找能替代放射性标记核苷酸探针的方法有两个原因。^{32}P是最普遍使用的一种同位素，但其半衰期短，且许多诊断实验室不具备完善的处理这种同位素的装备。因此，人们越来越喜欢使用非放射性的报道系统。一些使用非放射性探针的例子，不但有病毒检测方面的还有关于转基因植物测定分析方面的。Accotto 等（1998）认为，非放射性报道系统的数量不断增加，可分为 3 个基本类型：直接修饰探针 DNA 碱基的、前体化合物与探针 DNA 或 RNA 相结合的以及标记的核苷酸前体整合到探针上的。

i. DNA 的直接修饰

各种修饰的碱基具有特异的免疫原性，可以和与酶相结合的抗体相互作用而被检测到。

ii. 前体化合物与 DNA 的结合

形成非放射性报道系统的主要方法之一是将化合物与 DNA 交叉结合。这些化合物或者是一种酶能直接催化颜色反应或发光反应；或者是能和与酶结合的抗体或其他分子反应的分子。前者的例子是辣根过氧化物酶（HRP）或碱性磷酸酯酶（AP）与 DNA 交叉结合。这两种酶是一些商品化的产品的基本组成部分，如增强的化学发光系统（ECL）。HRP 的缺点是它对较高的温度敏感，因此杂交需在 42℃、有尿素的条件下进行。光生物素是生物素的一种光反应衍生物，在可见光的照射下可以和单链或双链的 DNA 或 RNA 发生交联反应。

iii. 标记的核苷酸前体整合到 DNA 链上

这一方法和上面提到的用于核酸的放射性标记的方法基本相同。有几种形式的生物素标记的核苷酸，如第 5 位上标记的嘧啶、N6 位标记的腺嘌呤及 N4 位标记的胞嘧啶。标记的 dNTP 的整合方法会影响探针的灵敏度。

一个商品化的试剂盒就是以地高辛标记的 dUTP 整合进探针为基础，然后通过抗体-酶复合体检测地高辛。

iv. 寡聚核苷酸的标记

以上方法也可以用于标记寡聚核苷酸探针。例如，寡聚核苷酸合成过程中整合进生物素和 AP，同样的分子也可以和寡聚核苷酸相交联。

v. 报道分子的检测

目前的检测方法通常是通过一种酶催化底物的反应而生成一种有颜色的或发光的化合物。有颜色的产物必须是不溶性的（不同于 ELISA 反应中有颜色的产物）。最常用的酶是 AP 和 HRP，检测系统和 Western 印迹一样。

发光系统与生色系统相比有几个优点：结果显示的很快，所以很容易保存持久的记录，将膜暴露到感光胶片上可以检测到发光反应释放的光；由于很容易破坏掉大多数发光化合物，可以使用不同的探针重复探测；使用恰当的装置，可以检测出杂交的探针的数量，由此能够确定相互之间的关系。其中 HRP 和 AP 的发光系统已得到了发展。在上面提到的 ECL 系统中，正电荷修饰的多聚化的 HPR，与 ssDNA 或 RNA 交联，催化过氧化氢生成氧，氧再氧化氨基苯二酰-肼（鲁米诺，Luminol）。这是一个化学发光反应，各种酚类化合物能增强释放出的光。Durramt（1990）综述了这一系统和其他各种以 HRP 为基础的系统。以 AP 为基础的系统之一是酶作用于 O-磷酸基-D-萤光素（D-luciferin-O-phosphate）产生游离的 D-萤光素（D-luciferin），后者在荧光素酶的作用下发生氧化反应释放出光。在另一系统中，AP 使磷酸化的苯基二氧吲哚发生去保护，分子间的能量转移到一种可溶性的胶囊荧光团使释放出的光得到加强。在地高辛系统中，底物是 3-(2′-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3″-磷氧基)-苯基-1,2-二氧吲哚[3-(2′-spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3″-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetane,AMPPD]，在碱性 pH 下经过去磷酸化可以释放出光。

生物素可通过它与亲和素（或链霉亲和素，streptavidin）的高亲和性（是生物大分子间最强的结合之一）进行检测；虽然金标记的亲和素也曾被用过，但是，通常亲和素是与一种酶结合的。用于探针的生物素也可通过抗生物素的抗体结合体进行检测。一种结合体涉及使用胶体金包被抗体，这一过程可通过银处理而得到进一步加强。

虽然生物素广泛用作报道分子，但的确也存在一些缺点。许多含有相当量的内源生物素的汁液样品，能产生假阳性。亲和素经常非特异性的结合于尼龙膜上而产生很高的背景，尽管使用一种蛋白酶对膜进行预处理能够降低这种影响。使用夹心杂交可以克服这些问题。

6. Southern 印迹

核酸经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离（参见第 4 章第Ⅲ节 A. 2. b 部分）后，印迹到膜上，再利用上面提到的使用探针的探测系统检测。这种方法比点印迹杂交方法更具有优

势，因为这样可以测定出检测到的核酸的种类和大小。

D. 聚合酶链反应

聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）可使目的 DNA 片段在体外经过酶催化反应得到扩增（Mullis *et al*.，1986；Scuki *et al*.，1988）。涉及合成的互补寡聚核苷酸引物与目的序列的杂交和使用热稳定的 DNA 聚合酶而进行的引物之间序列多拷贝 cDNA 的合成。通过 PCR，目的 DNA 片段能在体外酶的作用下得到扩增。每一循环包括寡聚核苷酸引物和 4 种脱氧核糖核苷酸存在的情况下的双链模板 DNA 分子的高温解链（熔解）；较低温度下引物和模板 DNA 中的互补序列的杂交（退火）；在 DNA 聚合酶作用下引物的延伸（DNA 合成）。图 15.17 表示了这一过程。每一循环过程中，两个引物之间的序列被加倍，因此，n 个循环后应得到 2^{n-1}次扩增，通常每个反应为 30～50 个循环。各种实验操作指南包括 Innis 等（1990）中都有关于这一技术的详细说明。

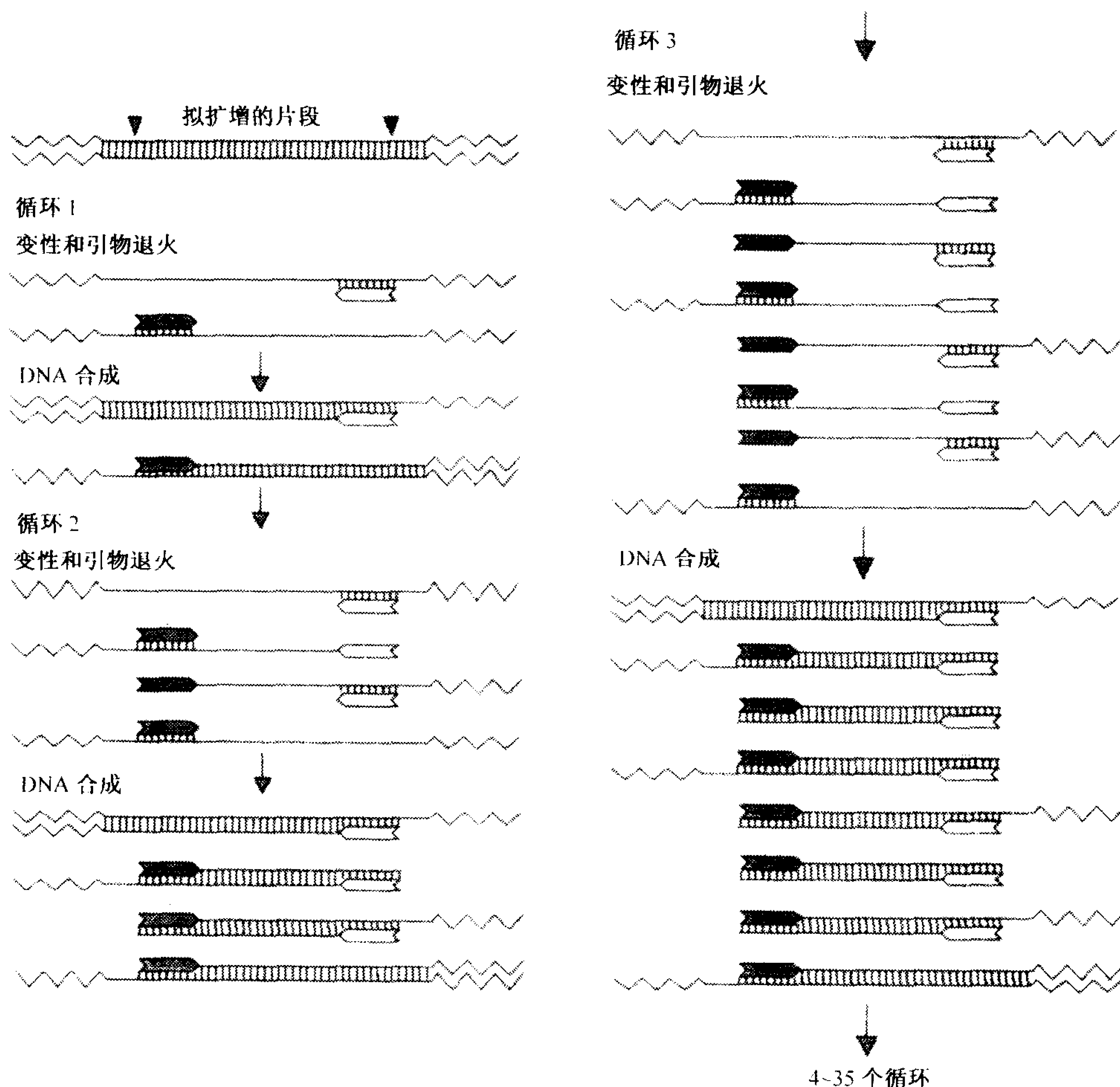


图 15.17　聚合酶链反应（PCR）。承蒙版权所有者（Springer Verlag GmbH and Co. KG）惠允，引自 Dijkstra 和 de Jager（1998）。

引物的选择依赖于目的核酸的序列。使引物的 3′ 核苷酸和目的序列的相应核苷酸互补是绝对必要的。通常，引物长为 18～25 bp，T_m 值在 55～65℃（参见第Ⅴ节 C. 1. a 部分中短序列的 T_m）。

因为 PCR 是基于 DNA 的方法，对于只有 RNA 基因组的大多数植物病毒不能直接应用。但使用一个引物和逆转录酶可制备 RNA 基因组的所需区段的 cDNA。可以此作为 PCR 的起始模板，这种方法已得到广泛的应用，称为 RT-PCR。一种进一步改进的方法是将 PCR 和使用固定抗体捕获病毒粒体相结合，称为免疫捕获 PCR（IC-PCR 或 IC-RT-PCR）。

现已得到证实，PCR（和 RT-PCR）是病毒检测和诊断的强有力的工具，能够直接用于产生可被凝胶电泳确定的预期大小的 DNA 产物。不同引物的选择可用来区分一种病毒的不同株系或使用在特定位置含有不同核苷酸的引物来确定不同属。也可以扩增存在株系差异的限制性内切核酸酶切割位点的区段用以区别不同的株系。如上面提到的，通过在反应过程中整合进报道核苷酸的 PCR 已广泛用于制备杂交探针。为了说明 PCR 在病毒检测和诊断中的广泛应用，下面举出一些应用的例子，但并不是所有应用这一技术的全面收集。

如上面第 8 章论述的（第Ⅸ节 B. 4 部分），BSV 序列经常整合进寄主基因组中。这一发现揭开了直接 PCR 在这种病毒的游离体侵染（episomal infection）诊断中的应用。Harper 等（1999）描述了一种对游离 BSV 特异的 IC-PCR 方法。在一个封闭的试管中进行 IC-RT-PCR，可以直接检测到叶片和根内存在的 TSWV（Tian *et al.*，1998），以及植物组织和单个蚜虫样品中的 CTV 和 PPV（Olmos *et al.*，1999）。

在代表四个症状类群的 10 个 PVY 分离物的 RFLP 分析中，通过 RT-PCR，所有的基因组均扩增出两个片段（Glais *et al.*，1998）。使用 7 个限制酶，根据 5′端片段分为 3 个 RFLP 组，根据和生物多样性相关 3′端片段可分为两组，一组分离物表现出是来源于重组事件。许多马铃薯 Y 病毒属病毒的 CP 有两个保守的氨基酸区段（MVWCIENG 和 QMKAAA）。尽管有些多余的核苷酸，这些保守的模体已应用于制备属特异性的引物（Langeveld *et al.*，1991；Pappu *et al.*，1993）。Marie-Jeanne 等（2000）使用这些引物，用 RT-PCR 从侵染禾本科（Poaceae）植物的几种马铃薯 Y 病毒属病毒中扩增出一个 327 个核苷酸的片段，再通过 RFLP 区分不同病毒。马铃薯 Y 病毒属病毒 CP 的其他保守区也被利用过（Colinet *et al.*，1994，1998）。

关系很近的病毒可以通过多重 RT-PCR 加以区分（Colver and Henry，1999），使用 WSSMV 或 WYMV 特异性的多个引物即可将二者的片段均扩增出来。但对关系很近的 BaMMV、BaYMV 和 OMV 的扩增却没有得到 PCR 产物。

高保守区的简并引物已被用于检测白粉虱传播的双生病毒（Rojas *et al.*，1993）。使用通用的和株系特异的启动子序列可区分 WDV 的不同株系（Commandeur and Huth，1999）。

植物、土壤和介体中的 BNYVV 的早期检测使用的是一种高灵敏度的方法，与 PCR 和地高辛标记有关（Fenby *et al.*，1995）。

目前 PCR 广泛用于植物或昆虫的原生质体的检测和鉴定（Lee *et al.*，1993；Marzachi *et al.*，1998；Seemüller *et al.*，1998）。

第Ⅵ节 讨论和结论

生物学、生理学和分子技术的应用为植物病毒的检测和诊断提供了一个很大的工具袋。这么比喻是为了强调在本章开始的介绍部分中指出的“确定要解决的问题是非常重要的”。如果想要确定植株是否被病毒侵染，若目的是为了检疫，就不必采用鉴定病毒株系的复杂技术。另一方面，如果正在研究某一潜在的抗性基因（或转基因）的持久性，那么对病毒的变异范围的了解是很有用的。因此，必须根据目的需要选择最好的技术。在做出这种决定时，必须考虑以下几点。

1．所需的灵敏度

有很多关于各种检测方法相对灵敏度的讨论，但很多血清学的和以核酸为基础的测试的灵敏度都能满足大多数实验目的，因此需选择使用最方便的方法。如果希望操作起来简单、快且成本低，可选择基于免疫学或核酸杂交的点印迹的方法。测试田间样品，可考虑选择试剂盒，如检测马铃薯病毒的试剂盒，其技术基础和家庭使用的妊娠试剂盒一样。

对于每种病毒的情况不同，建议通过对比几种方法，最后再选择最合适的方法。例如，使用 MAb 比较血清学和核酸技术的方法时发现，ELISA 技术是最适合于进行田间的 TSWV 的常规诊断（Huguenot *et al.*，1990）。另一方面，IC-RT-PCR 的灵敏度比 ELISA 高出 1000 倍，因此应用 IC-RT-PCR 能检测到蚜虫个体内的 PVY（Varveri，2000）。同样，使用 PCR 可以检测蚜虫个体内的 BYV，但应用 TAS-ELISA 则不能（Stevens *et al.*，1997）。较高的灵敏度也可使多个样品集中在一起检测，如种子，只有小部分被侵染也可以检测到。

2．样品数量

如大量样品需要测试，选择测试方法时考虑到以下因素是很重要的：①特异性；②灵敏度；③操作难度和速度；④设备和消耗品花费。血清学测试可提供一定范围的特异性，从极度特异的 MAb 到有较宽交叉反应的多克隆抗体。但有时对一定范围内的相关病毒的测定，核酸杂交可能提供更好的测试结果（Harrison *et al.*，1983）。

3．测试的样品材料

很多情况下，尤其是树木，病毒的分布不一致。因此取样时需要很仔细，建议在一棵树上取几个样品。植物材料的预处理能影响到病毒的分布，例如，一些马铃薯变种的块茎储存于高温下 4 周可提高用 ELISA 检测 RMTV 的可靠性（Sokmen *et al.*，1998）。

4．技术的可靠性

一种技术的不可靠性表现在两个方面，部分测试样品取自植物的不含病毒的部分，以及植物成分对反应的抑制或使用材料的限制（如 PCR 中一个引物的错配），结果造成反应的假阴性。假阳性结果可能由于某些植物成分引起的，尤其是当测试某些新的植物

种类时（Murphy *et al.*，1999b）。

5. 可利用的设备和技术

大多数植物病毒的常规的、可靠的检测通常不需要贵重的设备。有些是例外的，如第Ⅴ节D部分描述的BSV的检测需要使用免疫电镜技术（ISEM）（Lockhart，1986）或IC-PCR。但是，可靠的良好的消耗品供应和不引起变性的储存方式是很重要的。同样，大多数基本的实验技术学起来是相当容易的，然而正确地学习以致能认识到潜在的错误根源是很重要的。

对于许多实验，如病毒钝化的研究，让人感兴趣的是依据病毒的不同特性采取不同方法所得到的测定结果。当对相同样品采用两种或两种以上方法时，需要记住的是，由于使用的方法的灵敏度不同，可能会面临解释其结果的困难。

除了和特定的测试方法相关的技术问题外，常规诊断中可能还会遇到一些普遍的困难。第一，各种影响植株中病毒浓度的因素，会影响到结果的可靠性。这点可能和整个植株存在的变异或如上面描述过的局部的变异有关；第二，两种或两种以上的病毒混合侵染的可能性，一些已鉴定的病害就是由重叠侵染（multiple infection）引起的（如莴苣斑点病，Falk *et al.*，1979）；第三，有时伴随病毒侵染的一些其他因素也会造成一种病态，番茄内部的褐变就是由于在果实成熟的特定阶段因TMV侵染而表现出的病态（Taylor *et al.*，1969）。

也许可以得出的唯一结论是生物学检测方法对确定其他技术的应用性，尤其是发生弱反应时，总是很重要的。在一系列适当的寄主上测得的症状表现和寄主范围仍将为可靠的诊断提供必要的依据。

最后，在诊断方面，专家组已制定了国际标准（FAO/IPGRI种质资源安全转运技术准则）用以促进国际种质资源的转运。这些准则详细说明了目前为确保植物材料不带有已知侵染此种植物的病毒可采用的最安全、最简单的测试方法。但需要时刻记住的是我们不能测定未知的病毒。

第16章　植物病毒的控制和利用

第Ⅰ节　导言

在第3章里已简略介绍了病毒带来的极大损失及为了减轻这种损失所采取的一系列控制措施。但是病毒除了带来危害外，还有其独特的可用之处。本章将介绍控制病毒的主要措施并讨论一些病毒的利用价值。

采用杀真菌化学药剂保护作物免遭侵染或减轻侵害程度，是控制真菌病害的重要手段。但目前还没有这样的直接方法来控制病毒病。控制病毒病的许多有效手段包括针对降低作物内外的侵染源、限制介体的扩散以及降低侵染对作物产量带来的损失等。总的说来，对于特定地区，这些都不是解决病毒病的长期永久方法。控制病毒病通常就像进行一场战役，需要年复一年建立病毒控制程序、各个生产者重视病毒控制并进行相互合作。但也有一些例外，如抗某一特定病毒的资源被发现或被成功转入到农业生产栽培品种中去。随着抗病毒转基因植物的发展，这种病毒控制方法变得越来越重要。但即使具有常规和转基因抗性存在，这种保护作用也不是永久的，因为当新的病毒株系出现时，原先抗病毒的品种也会感病。

这里将详细考察试图控制病毒病的各种方法。应该明白感染病毒有时会增加其他病害的发生率，在这种情形下，我们需要控制病害的各种方法。例如，甜菜黄化病毒侵染增加了植株对链格孢菌（*Alternaria*）的易感性。喷洒合适的杀菌剂，在一些季节中可减轻第二种病毒感染的效果（Russell，1966）。

确定侵染某一特定作物的一种或几种病毒，对于实施有效的病毒控制措施是十分关键的，仅仅靠症状来诊断有时会引起误导。例如，莴苣病毒病可以由一种蚜虫、叶蝉、蓟马、线虫，或一种真菌介体所携带的14种病毒引起（Cock，1968）。这些病毒中的许多都可产生棕色坏死斑点或叶片变红褐色，并在以后出现褪绿矮化症状。另一个例子是英国（Russell，1958）和美国西部的甜菜黄化病。

在设计控制某一特定作物病毒的策略时，最重要的一环是对该病毒流行学方面知识有所了解，因为这可以使我们预测病害的发生。有关这方面的内容已在第12章Ⅴ部分讨论过。

显而易见，世界上严重的病毒病大多由直接或间接的人类活动引起（Thresh，1982）。可导致流行病的重要人类活动包括：①随着带毒种子和无性材料的运输而向无病区传播病毒；②传毒介体向无病区输入；③引进一个对该地区原有病毒极其敏感的作物品种；④种植单一作物，也就是大面积栽培遗传上一致的作物，而不是传统的多种作物搭配种植；⑤灌溉复种作物（overlapping crop）来延长作物生长季节；⑥在同一块土地重复种植同一作物；⑦化肥的使用以及除草剂或其他杂草控制方式应用的日益增加。

近年来，在控制病毒病研究方面最有活力的领域是：①通过经典的遗传学方法来培

育抗病毒或对病毒具免疫性的作物品种；②用各种策略来控制传毒介体；③种子和无性繁殖体等无病毒原种（stock）生产；④含有病毒基因而对该病毒具抗性的转基因植物生产。Harris 和 Maramorosch（1982）以及 Walkey（1991）讨论过控制病毒病的一般途径，对于控制特定病毒的方法已有多人做过综述，例如，Smith 和 Barker（1999）对黄症病毒属、Thresh 和 Otim-Nape（1994）对 ACMV、Gonsalves（1998）对 PRSV 以及 Hadidi 等（1998）在其专著中多处也对一些病毒的控制做了介绍和回顾。

本章所讨论的病毒控制方法的许多数据都是从实验室和田间试验得到的。由于涉及许多变量和众多国家，因此还很难评价某一特定病毒控制方法或一套程序在常规理论基础上进入真正商业化应用的实际程度。

目前越来越多的注意力放在了几种策略相互整合在一起来控制病毒的可能性，本章介绍了其中几种。但对于这些措施在田间实际应用是否有效，或它们是否保持着让人乐观的设想也还很难评价。当有足够的设备和专业人员时，一种多方位、多学科的（multidisciplinary）综合控制措施可能更加有效。其中一个例子就是夏威夷用多种措施综合控制由 TSWV 引起的病毒病（Cho *et al.*，1989）。Jacobsen（1997）讨论了结合植物病原控制与害虫控制来进行有害生物综合防治的系统（IPM）。

第Ⅱ节　清除或避开侵染源

A. 清除作物内或作物附近的侵染源

很明显，如果种植的作物不带毒，同时田间也没有侵染源（source of infection），或虽然有病原物，但还未近到能扩散并侵染作物，那么就不会存在病毒侵染问题。

只有在掌握有关病毒侵染源和该病毒侵染作物的途径的详细知识的基础上，才能决定在何种程度上清除田间侵染源是有效的。Thresh（1988b）的综述文章中介绍了根除侵染源来作为一种病毒控制的措施。Ollennu 等（1988）、Garnsey 等（1998）对 CSSV 和 CTV 侵染源的根除措施也做了介绍。

1. 病毒的活体寄主

作为侵染源的活体寄主可能包括：①通过种子传播病毒的多年生和一年生杂草寄主，或在一年中有几个重叠世代的一年生杂草寄主；②受侵染但只表现轻微症状的多年生观赏性植物，如唐菖蒲常常感染 BYMV，然后传播给相邻的一年生豆科类作物（Hull，1965）；③非亲缘作物（unrelated crop）；④前一季作物的残株，这些植物可能是根用蔬菜，如马铃薯或籽生自生植物（seedling volunteer）；⑤两年生采种作物接近成熟时恰逢一年生作物出苗。

在理论上，清除大多数这些侵染源是可行的，但在实际操作上却很难，而且几乎不可能，尤其是在有私人种植园的作物种植区。在温带和亚热带地区私人种植园和相邻农场中经常栽植不同的植物，许多这些植物携带着可造成严重经济损失的病毒。在这样的种植地块很难或几乎不可能有效地控制病毒侵染。热带国家作物栽培的多样性，使得开展控制病毒侵染源头这项工作变得极其困难。

一个地区是否能成功地消除某种病毒的其他寄主，在极大程度上取决于这一病毒的寄主范围。如果病毒的寄主范围很窄，那么采取控制转主寄主（alternative host）的方法是可行的，反之像CMV和TSMV这两种病毒，通常不可能采取这一方法来控制。

2. 植物的残枝落叶

土壤中或附着在类似温室结构上的植物残留物，有可能寄生了经机械传播的病毒，这些病毒从而成为下一季作物的侵染源。对于控制像TMV这样极其稳定的病毒，特别在同一地区每年都生长着易感染该病毒的作物，那么进行彻底的卫生清扫工作是十分重要的。当前实际生产上常用的土壤局部消毒方法，对于从温室中彻底脱除ToMV可能是十分困难的（Broadbent *et al.*，1965；Broadbent，1976；Lanter *et al.*，1982）。在这一方面的重大进展是用沙子或泥炭（peat substrate）每年更新土壤。

3. 去劣去杂和根除计划

从栽培作物中清除已感染病毒的植物有时可能值得一试。如果病毒能很快从侵染源向周围扩散传播，那么对该作物进行去劣去杂（roguing）将没有任何作用。但如果病毒扩散较慢且只在该作物内传播，那么进行该项工作可能是值得的，特别在作物生长季节的早期。即使是多年生作物，如果病害扩散较慢，那么通过拔除感病植物后重新种上健康植物，也可得到相当好的收成。用Van der Plank（参见第12章第Ⅳ节A.2.a）提出的公式来研究已感染植物在田间的分布，可揭示病害是如何在作物中进行扩散传播的。

在某些情况下，采取去劣去杂这种措施会扰乱感病植物上的介体（vector）而提高发病率（Rose，1974）。在许多作物上，新近染病的植株在其没有显示明显症状前，充当了下一步侵染的毒源（source of virus）（Beemster，1979）。

大多数成功的病毒清除计划都是在木本作物上实现的。决定成功的因素是：①感病树木数量和侵染中心（infection foci）相对较少；②自然传播率较低；③掌握有关病毒侵染程度和分布方面的丰富资料；④迅速、可靠及便宜的病毒诊断程序，并具有进行快速而范围广的调查及清除病树方面的资料。

在非洲热带地区进行的常规去劣去杂试验，对于控制木薯ACMV很有效（Robertson，1987），但该方法未被广泛应用。拔除感病植株来控制病害的最成功例子之一是在澳大利亚东部，该防治方法降低了香蕉BBTV的发生率。在20世纪20年代晚期，政府开始实施有关消灭感病植物和放弃种植园方面的法规。在大约10年时间内，香蕉束顶病不再是产量的制约因素，从这一点上看，该方法是有效的。Dale（1987）、Dale和Harding（1998）将这项计划的成功归因于下列几个因素：①除了香蕉和少量野生香蕉外，该病毒缺少其他毒源（virus reservoir）；②掌握了主要毒源是种植材料，同时病毒由蚜虫传播等方面的知识；③当地种植的香蕉栽植在小而分离的种植园中，而不是分散分布且赖以为生的作物；④严格实施政府法规；⑤许多农场主间进行有效的合作。

图16.1显示了采取广泛的根除措施来控制CTV的一种模型。Chan和Jeger（1994）提出用拔除感病植株并重新种植健康植株进行病毒病动态学分析的模型。他们指出如果只在侵染后才进行去劣去杂，则该项措施对于控制病毒没有任何优势。在低传

染水平下，只拔除已具有传染性植株就足够能根除病害，但如果在高传染水平下，那么必须同时去除已具传染性和已被感染但不显症状的植株。该模型显示了在实际生产中，在何种程度上进行去劣去杂工作才能实现根除病毒病的目的。Smith 等（1998）在菲律宾运用一种模型来探讨不同程度地感染 BBTV 的香蕉种植地块的各种去杂率。这一模型显示，在所有香蕉种植地块中进行持续不断的去杂去劣工作可持续增加小小的收益。但若将重点放在病害由外向内传播且感染最多的地块，则会导致病害显著增加。

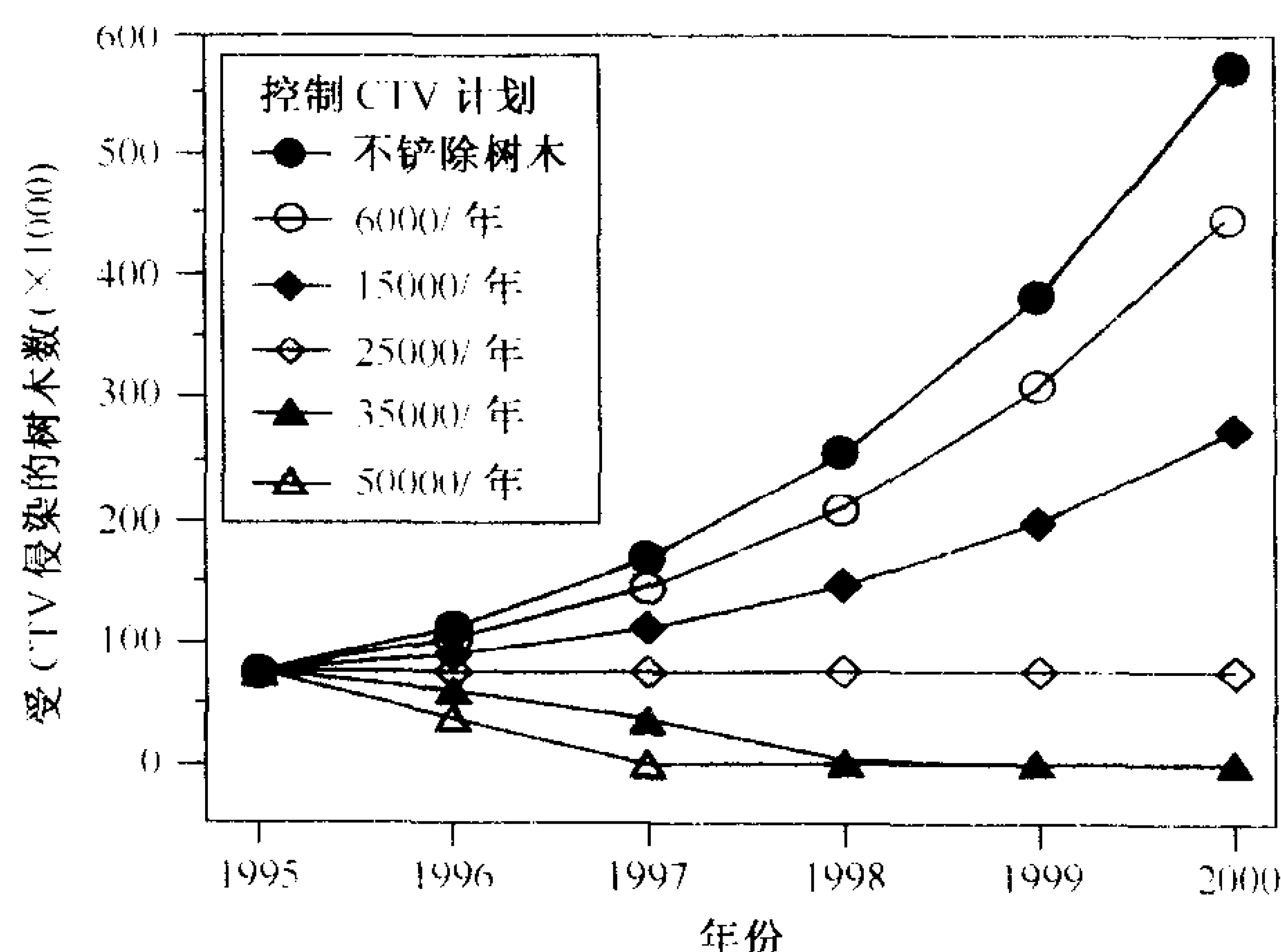


图 16.1 不同根除率对 CTV 侵染香蕉的抑制作用。本图来源于加州香蕉根除项目模型，调查显示大约 80 000 hm^2 上有 75 000 棵 CTV 侵染的树，每年以 50% 速度增加，如果每年根除 25 000 棵，则病树保持目前的静态数目；如果开始根除 50 000 棵，与每年根除数目较少的情况相比，病树群体迅速减小（承蒙版权所有者（c）The American Phytopathological Society）惠允，引自 Garnsey 等（1998）

4. 田园卫生

对于一些可经机械传播的病毒，特别是 TMV 或 ToMV，在作物种植期间的人类活动和日常管理是病毒传播的重要途径。一旦 TMV 或 ToMV 进入烟草或番茄这一类作物体内，那么在种植期间，特别在此期间对植株进行除侧枝和捆绑等农事操作时，将很难阻止病毒扩散。病毒控制措施包括洗手和劳动工具的消毒处理。Broadbent（1963）推荐用 3% 正磷酸三钠（trisodium orthophosphate）溶液进行消毒处理。工人的劳动服装有可能受到 TMV 的严重污染，从而通过接触来传播扩散病毒。TMV 在衣服的黑暗封闭处可保持 3 年以上的存活力（Broadbent and Fletcher，1963），但在日光下几个星期后失活。干洗或用加了清洁剂的热水洗涤可大大降低衣服受病毒污染的程度。

TMV 是最稳定的机械传播病毒，而别的病毒则或多或少通过切割刀具和其他工具进行传播，这些病毒包括 TBV、CymMV、PVX 和 PSTVd。这些机械传播因子对于温室作物来说是个特殊问题，因为那里植物生长茂盛、植株之间挨得近、高温和经常性用手接触等都是促进病毒传播的重要因素。

因为机械传染是类病毒在田间扩散的重要途径，所以减少劳动工具上的病毒量是重

要的控制措施。但这也提出了一个难题，因为类病毒具热稳定性，同时在许多常规使用的去污剂也较稳定。短暂暴露于0.25%次氯酸钠或次氯酸钙可能是消灭类病毒的最佳方法（Garnsey and Randles，1987)。最早使用且也是最有效控制类病毒的方法之一是避免侵染源，该方法对易感类病毒的无性繁殖为主的作物，如马铃薯和菊花比较有效。这可能是因为在田间除了人类外没有其他传毒介体存在的缘故。

B. 无病毒种子

如果病毒通过种子传染，那么这可能是植株感染病毒的最重要来源，因为病毒在作物生长的极早期就进入植株内，并将病毒传染给其他幼小植株。同时，种子传染可造成田间出现分散的发病中心（scattered foci)。如果种子染病是病毒的重要或唯一来源，则那里的作物需要与其外界侵染源实施合理的隔离措施，采用无病毒种子可有效地控制病毒病害。影响种子传毒力的因素已在12章（第Ⅲ节A.1部分）进行了讨论。

采用无病毒种子控制莴苣花叶病毒（LMV）就是一个极好的例子（Dinant and Lot，1992)。Grogan等（1952）发现在加利福尼亚，用无病毒种子生产的作物，在收获时花叶病发生率大大低于相邻地块用商品种子生产的作物。在过去一段时间内，病毒控制措施曾经不令人满意，直到人们意识到如果传毒介体蚜虫很活跃，那么即使是很少一部分种子染毒，也会造成作物发生严重的病毒病（Zink *et al.*，1956)。

Tomlinson（1962）在英国的环境条件下也得到了相同的结果。为了利用无病毒或低病毒感染率种子来有效地控制病毒病，那么让采种植物生长在一个合适的隔离地点并实施种子合格证书计划是很有必要的。目前越来越多的研究表明，即使是0.1%的种子带毒率也不能有效地控制莴苣花叶病（Kimble *et al.*，1975)。在加利福尼亚Salinas Valley地区，采用带毒率小于0.003%的种子繁殖材料在实际生产中可持续控制病毒病。

加利福尼亚Salinas Valley地区在引进无病毒种子计划前5年，莴苣产量为约每亩140箱（carton)，实施该计划后的5年内，平均产量达到每亩190箱。产量增加的很大部分可归因于降低了由LMV造成的损失（Kimble *et al.*，1975)。

用ELISA方法可检测大批量种子的病毒感染程度。如果种皮上携带的极大部分病毒不参与种子传毒，那么可能需要将种子剥去种皮后再检测胚带毒情况（Maury *et al.*，1987)。在美国，针对BSMV的种子证书计划，可避免因大麦病害而造成的数百万美元的损失，从而得到了广泛的认可（Carroll，1983)。

为了加强对大批量种子进行病毒检测的质量控制，现已将统计学和血清学方法应用于种子质量鉴定证书（Masmoudi *et al.*，1994)。ELISA法可检测大样品组（每组200～500粒种子)，也可同时在这样大小的样组内检测一个种胚的带毒情况。

感染ToMV的番茄种子表皮携带病毒。当种子发芽时，病毒侵染子叶，同时当其穿孔出来时可将病毒传染到整个植株。在0.1 mol/L HCl中加热干种子，或用正磷酸三钠或次氯酸钠处理可对种子进行消毒（Gooding，1975)。

在国内或国际种质资源库中消灭种子传播的病毒十分重要。在USDA种质资源库新增加的207份普通菜豆（*Phaseolus vulgaris*）中，60%带有一些感染了BCMV病毒的种子（Klein *et al.*，1988）。至少存在这样一个例子，即当通过判断种皮颜色和同工

酶基因型（isoenzyme genotype）来消除豌豆中感染 PSbMV 的个体时，可导致遗传多样性的损失（Alconero *et al*.，1985）。在这样的情况下，消除种子传播的病毒应采用那些不会使特定植物类型造成选择性损失的方法（参见下面部分内容）。

C. 无病毒无性原种

对于许多无性繁殖植物来说，最重要的病毒来源是植株自身受病毒的慢性侵染（chronic infection）。对于这样的作物，要形成无病毒无性系的最成功方法之一，就是获得无某种病毒的无性繁殖个体。这涉及两个方面，首先要找到具有优良园艺性状的所需品种的无病毒品系。当该品种百分之百地受到病毒感染时，就必须尝试去获得一棵完整的无病毒植株或植株的一部分。其次，得到了无病毒无性系后，用于无病毒栽培的原种（foundation stock）或母本树品系必须确保无病毒，同时也应在足够大的范围内培育其他繁殖材料，这些材料在生长过程中不受或较少受到病毒再侵染。那么这些无性繁殖材料就可用作商品化种植。

1. 鉴定无病毒材料的方法

通过检测肉眼可见的病毒病症状对于选取无病毒材料往往是很不够的，因此必须有合适的病毒检测方法。可供选择的病毒检测方法有很多，但最适合的方法必须取决于病毒和其寄主植物。对于许多病毒，特别是木本植物的病毒来说，用嫁接方法将病毒接种到一株或多株指示植物上进行显症实验是必需的，但该实验过程相当慢。病毒在植株体内的分布可能是不均匀的，特别在感染病毒的早期，因此要确定植株是否无病毒，必须在连续的生长季节中进行重复试验。例如，Hampton（1966）发现，假如每棵树检测 4 个芽，感染 PDV 第一年的樱桃树中，极大部分没有检测出 PDV（占一个品种中的 29%～63%），但在感染该病毒 3 年后，其检出率大大提高。病毒在草本植物体内的分布也可能是不均匀的（参见第 9 章第Ⅱ节 J 部分）。Beemster（1967）发现接种了 PVY 的马铃薯，不是所有的块茎都受到了感染，而且同一块茎中，也不是所有部分都受到了该病毒的侵染。马铃薯块茎的根端（heel end）比芽端（rose end）较少受到病毒侵染。所以用芽端来检测病毒比较可靠。

一些病毒可采用机械接种到该病毒的指示植物上来进行检测，但目前别的诊断方法在检测病毒侵染的灵敏度方面也可与之相媲美（参见第 15 章）。

2. 获得无病毒植株的方法

a. 自然产生的无病毒材料

偶然地，我们会发现一个品种的某些植株个体，或某一特定地区的一些植株不带病毒。如果所有的植株都受到了感染，那么就要利用病毒在植株体内有时会呈现不均匀分布这一特性来得到无病毒个体。这种现象在一些果树病毒中很常见，如人们常将一棵树的某一未感染病毒部分作为接穗。虽然一棵树的其余部分可能系统感染了病毒，但其新梢的顶部由于生长迅速，有时可能不带病毒。也正是由于这个原因，Holmes（1955）得到了无 TSWV 的大丽花插条。这种得到无病毒材料的方法已成功应用于一些病毒寄主植物上。但许多无性繁殖品种实际上已完全被一种病毒感染，对于这种情况，可采用

后面将要介绍的一种或几种特别处理方法来获得无病毒个体，进而利用它来扩繁。有些报道显示病毒脱除现象可自然发生，例如，当郁金香球茎在无线虫的土壤中生长几个季节后，一部分球茎会成为无病毒球茎（van Hoof and Silver，1976）。

b. 热处理

热处理是获得无病毒材料的最有效方法。用热处理方法可使许多病毒在至少一种寄主植物上被脱除（Walkey，1991）。

热处理通常采用两种植物材料。植株的休眠部分如块茎或接穗（budwood），往往比正在生长的组织更能忍受高温，该方法的脱毒效果可能依靠对病毒的直接热钝化。温度和处理时间的变化范围较大（35～54℃，从几分钟到几小时）。也常用热水处理来得到无病毒材料，因为热空气在较短的处理时间内，可能会引起加热不均。湿热处理脱除病毒的效果优于干热处理，除非需要处理的植物组织是完全溶于水的。

更常见的是将正在生长的植物进行处理，同时常利用热空气处理而不是热水处理。通常将植物在35～40℃下处理几个星期，这种方法可使正在生长的植物在处理期间的成活率较高。热处理的具体细节变化较大，必须根据每一寄主-病毒组合凭经验进行确定。通常在热处理刚一结束，就切下被处理植株的新梢，因为这些新梢可能不含病毒。例如，将热处理马铃薯芽进行茎尖培养，可获得一部分无PVX植株（Faccioli and Rubies-Autonell，1982）。将大蒜在38℃下进行热处理后，经茎尖组织培养得到的无病毒再生植株可从未热处理的25%～50%提高到85%。

有时，把外植体培养得到的组培苗进行热处理。草莓组培苗经过38℃热处理后，切取的4 mm长葡匐茎已脱除了草莓轻型黄边病毒（Converse and Tanne，1984）。同时该文作者认为热处理和葡匐茎茎顶培养对消除该病毒都有作用。

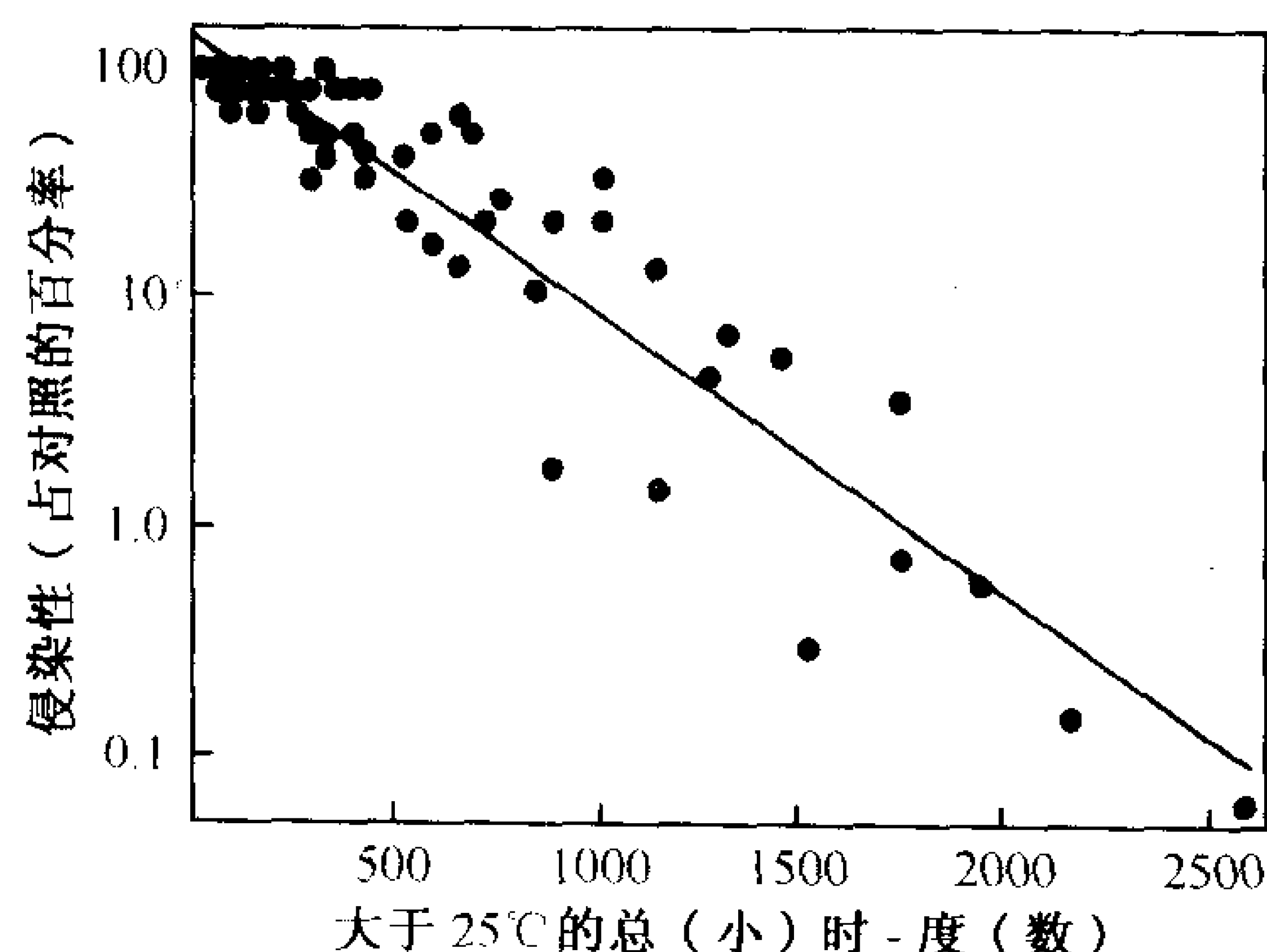


图16.2 在受侵染的黄花烟（*Nicotiana rustica*）组织培养物中，CMV的钝化和（来自各种昼夜温度交替方式的）25℃以上的总时度（total hour-degree）的关系图。经允许，引自Walkey和Freeman（1977）。

一种高温（约40℃）和常温（约20℃）交替热处理方式有助于减少高温对植物组织的伤害，同时还可以得到一些无病毒茎尖，但具体的处理方式常根据不同的寄主和病毒而定。这种热处理方式已应用于脱除豇豆的CCMV（Lozoya-Saldaña and Dawson，1982）和葡萄的GFLV、ArMV（Monette，1986）。减少和脱除病毒的效果可能取决于植株在高温下的处理时间，图16.2以脱除CMV为例说明了植株在不同的高温处理时间的脱毒效果。植物组织中的真正温度可能比测定的空气温度要低几度。

目前，还没有依据来预测一些植物种类是否能脱除某一特定病毒，且优先脱除病毒的潜在机制也不知道，但据推测它们与钝化已装配的完整病毒粒体和抑制病毒复制途径有关。

Dijkstra和de Jager（1998）的论文中展示了一种利用热处理脱除某一植物病毒的恰当方案。

c. 茎尖分生组织培养

在本书第 9 章（第Ⅱ节 J. 8 部分）已提到过病毒在茎尖分生组织中的分布。已经证明利用茎尖进行组织培养可有效地脱除某种病毒而获得无病毒无性繁殖材料。Hollings（1965）认为茎尖分生组织培养就是将顶端分生组织顶（apical meristem dome）和最上面两片子叶在无菌条件下进行培养这类分生组织块长 0.1～0.5 mm，因植物不同而异。不同植物种类在茎尖培养时，能存活的最小茎尖范围不同。例如，大黄（rhubarb）茎尖培养要求茎尖长度至少应达到 0.3 mm（Walkey，1968）。图 16.3 介绍了一种常用的茎尖组织培养方法（切除的茎尖越小，获得无病毒植株的概率就越高）。对于许多植物来说，如果采用目前常用的组织培养方法得到完整植株的再生，至少需要一片子叶。

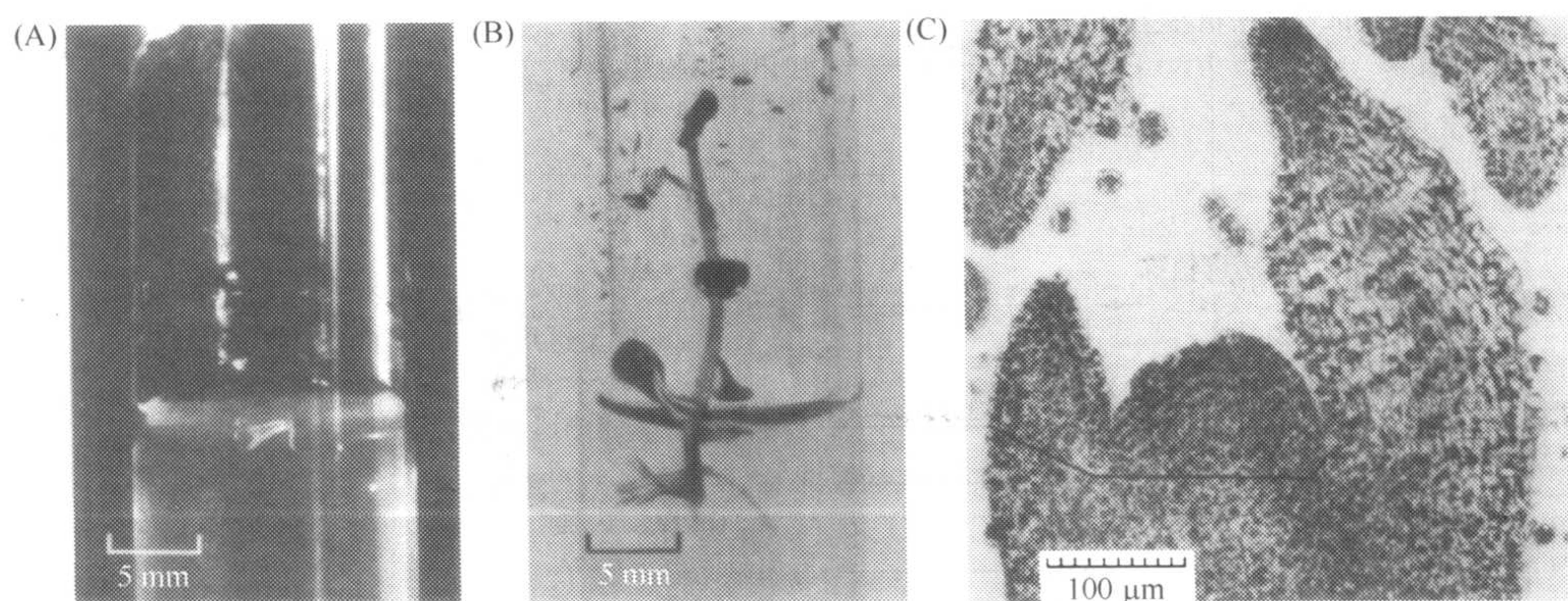


图 16.3　茎尖分生组织培养。(A) 由休眠分生组织萌发一周的马铃薯茎段；(B) 易于转移到土壤的马铃薯组培苗；(C) 显示两个叶原基的马铃薯顶端分生组织剖面，黑线上方显示一个用于顶端培养的叶原基。经允许，引自 Kassanis 和 Varma (1967)。

许多研究工作者采用了很多不同的培养基种类。培养基的基本成分就是矿物元素（大量与微量元素）、蔗糖、植物生长刺激物质如吲哚乙酸或赤霉素的合理配比，有时还要加琼脂。

只有部分植物的茎尖进行组织培养能得到无病毒植株。目前有时也不清楚到什么程度才能通过茎尖组织培养成功脱除病毒：①分生组织培养一般不含病毒，而一些茎尖却仍有病毒感染；②植株上有的分生组织部分带病毒，而有的则无病毒；③分生组织中的病毒在合成培养基培养中可被钝化。

如寄生在天南星科植物中的一些病毒（Hartman，1974），在 20～25℃条件下和合适的培养基中培养，就可很容易地将植株中的病毒脱除；但另外的病毒如 TRSV 和 PVX，在上述的培养条件下，这些病毒的大多数或全部都不能被脱除。对于这种情形，就需要将茎尖分生组织与热处理结合起来，该方面内容在前面已作过介绍。图 16.4 说明了热处理和茎尖培养相结合的脱毒处理方案。

将长约 1.0 mm 的茎尖直接微嫁接到无病毒组培苗砧木上，可作为茎尖培养的一种替换方法。已有报道表明一些病毒可通过该方法被脱除（Navarro *et al.*，1983）。

在茎尖培养前进行电处理可脱除马铃薯的 PVX（Lozoya-Saldaña *et al.*，1996）。也就是在马铃薯腋芽进行茎尖培养前，将马铃薯茎用 5 mA、10 mA 或 15 mA 电流处理

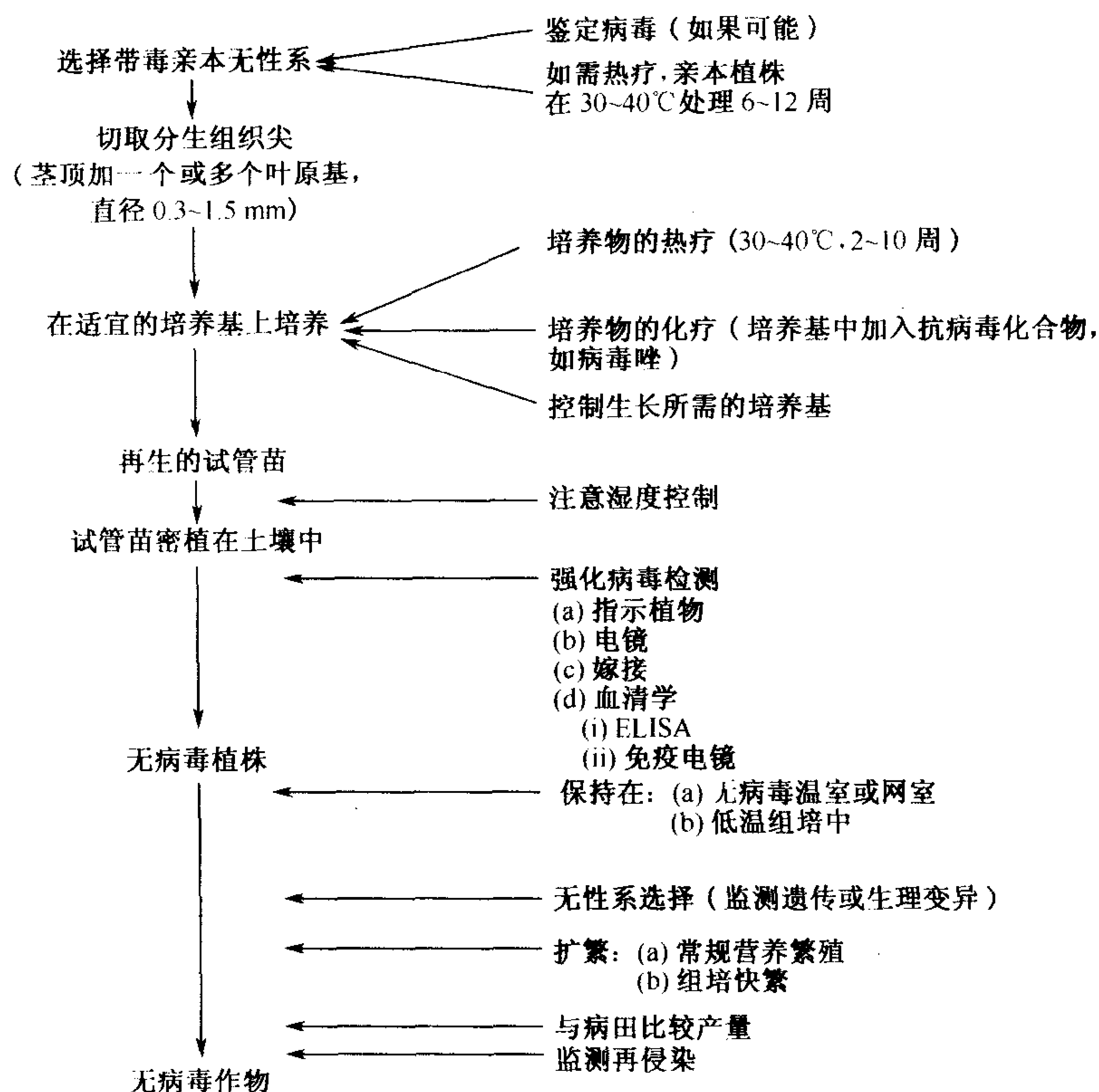


图 16.4 茎尖分生组织培养获得无病毒植株流程图。经允许，引自 Walkey（1985）。

5～10 min，这种电治疗可促进器官发生和病毒脱除。

当病毒出现在茎尖分生组织时，用茎尖培养方法来得到无病毒植株就很困难（Toussaint *et al.*，1984）。一些重要的热带粮食作物已通过茎尖分生组织培养而得到了无病毒植株，这些作物包括木薯（Adejare and Coutts，1981）、甘薯（Frison and Ng，1981）和多种天南星科植物（Zettler and Hartman，1987）。

Dijkstra 和 de Jager（1998）提出了一种用分生组织培养脱除植株病毒的适当方案。

d. 组织培养

将感染病毒植物的单个或一小团细胞进行组织培养有时可获得无病毒植株。例如，将一品红（*Euphorbia pulcherrima*）进行离体培养紧接着进行细胞悬浮培养可脱除两种病毒（Preil *et al.*，1982）。将感染了 TMV 的烟草植株小片组织进行振荡继代培养（shake subculture）后的再生植株不带 TMV（Toyoda *et al.*，1985）。从感染 TMV 的烟草（*Nicotiana tomentosa*）植株黄绿相间部分得到的愈伤组织，其再生植株有很大部分不带病毒（White，1982）。这表明叶片上感染 TMV 的区域，即局部病斑中的一些细胞实际上不带病毒。

将感染 BBTV 的 Cavendish 香蕉植株在 40℃高温下生长 12 周并结合茎尖培养，不能脱除该病毒（Wu and Su，1991），而将其进行组织培养并在 35℃下生长 3 个月（Wu and Su，1991）或在 28℃下生长 9 个月，可获得一些无病毒芽（Thomas *et al.*，1995）。

e. 低温

将植物置于低于病毒存活的常温条件下对脱除病毒的效果，还未做广泛的调查研究。低温对那些在离体条件下较稳定的病毒可能几乎没有作用。有些报道表明将植株置于低温下生长，可获得无病毒植物材料。Selsky 和 Black（1962）将感染 WTV 的草木樨（sweet clover）植株的插条在 14℃下生长，即使几代后的无性繁殖个体也没有出现肿瘤状物。从繁殖三代后的植株上切下插条，并将其在正常的温室条件下培养，95%的插条产生了第二代，即生根成活。这批第二代植株中有 90%没有出现肿瘤状物，表明这部分植株没有病毒。但是将 3 个桃树品种置于 4℃下生长很长时间却没有脱除 PNRSV（Heuss *et al.*，1999）。

将马铃薯和菊花进行茎尖组织培养并在 6～7℃的黑暗条件下生长 6 个月，其再生植株脱除了 4 种病毒（Paduch-Cichal and Krycyznski，1987）。

f. 化学疗法

单独用抗病毒药剂来获得无病毒植物材料的尝试很令人失望。有关这方面的治疗方法已有一些报道，但常涉及少数植物，或这些实验结果很容易用其他原因来解释。化学药剂治疗本身在病毒方面还未发现有实际的用途，但如果将药剂处理与热处理或茎尖培养结合起来，在有些情况下脱毒具有较大的优势。

已有实验采用一些化学合成物来脱除病毒。例如，Hansen 和 Lane（1985）将病毒唑（ribavirin 或 virazole），也就是鸟苷类似物，与苹果新梢茎尖培养结合起来，脱除了 ACLSV；Toussaint 等（1993）也用它脱除了建兰组培苗（Cymbidium culture）中的齿兰环斑病毒（ORSV）。2,4-二氧六氢-1,3,5-三嗪(2,4-dioxohexahydro-1,3,5-triazine)可用于脱除马铃薯组培苗（Borissenko *et al.*，1985）或马铃薯茎插条中的病毒（Bittner *et al.*，1987；Tomlinson，1981）。

3. 精选无性系繁殖材料的重要性

选择所需园艺性状的无病毒无性系材料，是任何病毒控制计划中的一个重要方面。在植物材料脱毒前和脱毒后都要进行这种选择。例如，在新西兰，种植用热处理后得到的无病毒苹果树后，苹果产量高且树势强，但出现了着色品种着色不佳的问题。这可能是由于在热处理前对无性系没有进行认真选择（Wood，1983）。如果用单细胞培养产生的纯系，出现的问题会更严重。

同样地，植物材料在脱除病毒后也会产生许多园艺性状的变化。例如，van Oosten 等（1983）发现脱毒的金冠苹果（Golden Delicious）在果皮性状方面产生了变化。

4. 给予足够的病毒检测时间的重要性

在生长的早期外表看似无病毒的植物，经相当长时间的潜伏期后可出现病毒感染症状，因此在实际生产中，通过分生组织培养得到的无病毒植株，在出售或释放前须经过一段时间进行病毒检测。例如，Mullin 等（1974）对组织培养的草莓后代进行观察，发现它们在 7 年后仍然没有发生经嫁接传播的病害。

最新的研究结果表明，一些逆转录植物病毒的序列可能在如组织培养和杂交等压力下激活（Harper *et al.*，1999b；Ndowora *et al.*，1999；Hull *et al.*，2000）（参见第 8 章

第Ⅸ节 B. 4)，这使得我们迫切需要一种更为健全的病毒检测程序。

D. 繁殖和保存无病毒原种

一旦获得了某一品种可应用的无病毒材料，就需要在避免原种受到病毒再侵染的前提下扩大繁殖，同时要从真实性和典型性方面对该无病毒材料的园艺学价值进行审定。然后才可进一步扩大实现商业化应用原原种。在原原种的扩大繁殖和在不同地区进行释放时，需要常设机构对其生长和销售等各个方面进行检查。一个经典的例子就是在英国实施的马铃薯证书计划，几十年来，该计划使马铃薯产量增加了 2～3 倍，其产量增长的很大部分要归功于病毒感染的下降。将经检测过的无病毒种薯在苏格兰部分地区进行隔离生长，那个地区不利蚜虫的早期迁移和繁殖（Todd，1961）。将经这些种薯产生的高级原种（high-grade stock）栽培在英格兰蚜虫发生率较低的其他地区，与种薯栽植地分开。要定期检测这些种薯的健康状况。同时杀虫剂的喷洒不仅限于马铃薯种薯种植地区，还要延伸到采种植物能够生长的其他地区（ Ebbels，1979；Slack and Singh，1998）。

目前世界上对各种农作物和园艺作物，包括核果类、李果类、葡萄等浆果类果树、马铃薯等都实施了类似的计划（Hadidi *et al.*，1998）。例如，在澳大利亚，其果树品种供应基地为该国的生产者提供无病毒果树（Smith，1983）。另一方面，对于几类植物特别是那些生产切花和球茎的作物，由于缺乏生产者之间的合作而有可能限制根除病毒计划的有效实施。

使无病毒材料得到迅速增殖是可能的，例如，Logan 和 Zettler（1985）介绍了一种在适合的培养基中进行新梢扩繁的方法，用该法可使一个无病毒唐菖蒲新梢在 30 周内增加到 50 000 个以上。当无病毒材料引入商业化种植中时，生产者之间的合作对于落实减少病毒再侵染的措施是十分必要的。避免在有线虫的地块种植像啤酒花这样的作物，对于繁殖无病毒材料很重要（Cotten，1979）。

在推广类似无病毒证书计划的过程中常常会出现一个问题，即许多植物在释放前必须检查核实其是否还存在病毒。Markham 等（1948）提出了一组病毒检测程序以节省劳力。在适当的取样前提下，田间感染病毒的植株数量可用一组样品中已染病植株的比例来进行估计。这种检测过程的可靠性随着被检植株数量的增加而提高。

任何一种取样和检测方案应当以两种观点进行考虑，这种概率首先要求弃去某一高感染水平，其次要接受某一低感染水平作物的概率。这种含有不同水平的接受和拒绝采用的概率，就有可能来进行取样和检测。

Marrou 等（1967）在检测莴苣种子是否带有 LMV 时发展了该种方法。他们在检测时，将几百粒种子的混合提取液接种到一种敏感指示寄主上，根据两项分布得到的图或表来解释检测结果。

当生产大批量无病毒植株或种子时，留一条类似的“审计途径”是十分必要的，只有这样才能沿着该途径回头去寻找产生任何问题的根源。其中的一条途径就是采用条码（bar coding）并结合电脑记录，这种方法可使个别或一批无病毒种子或植株都遵循无病毒材料繁殖和释放的整个过程。

E. 改进种植和收获程序

1. 打破病害循环

当一个地区生长着一种对某一病毒敏感的重要的一年生作物或一类亲缘相近作物时，那么这些作物就是该病毒在该地区的主要寄主。在这种情况下，确保该地区在某段时间内不生长该类寄主植物，可能会极大地降低病毒感染。在 Alberta 就有一个很好的例子，在那里通过控制冬小麦的种植日期，以避免与前茬春季或冬季播种作物重叠（图16.5)。将这一方法与在新的冬季作物出苗前进行清除自生的小麦和大麦植株、杂草等WSMV寄主结合起来，可在许多生产季节中有效地控制病毒病发生。

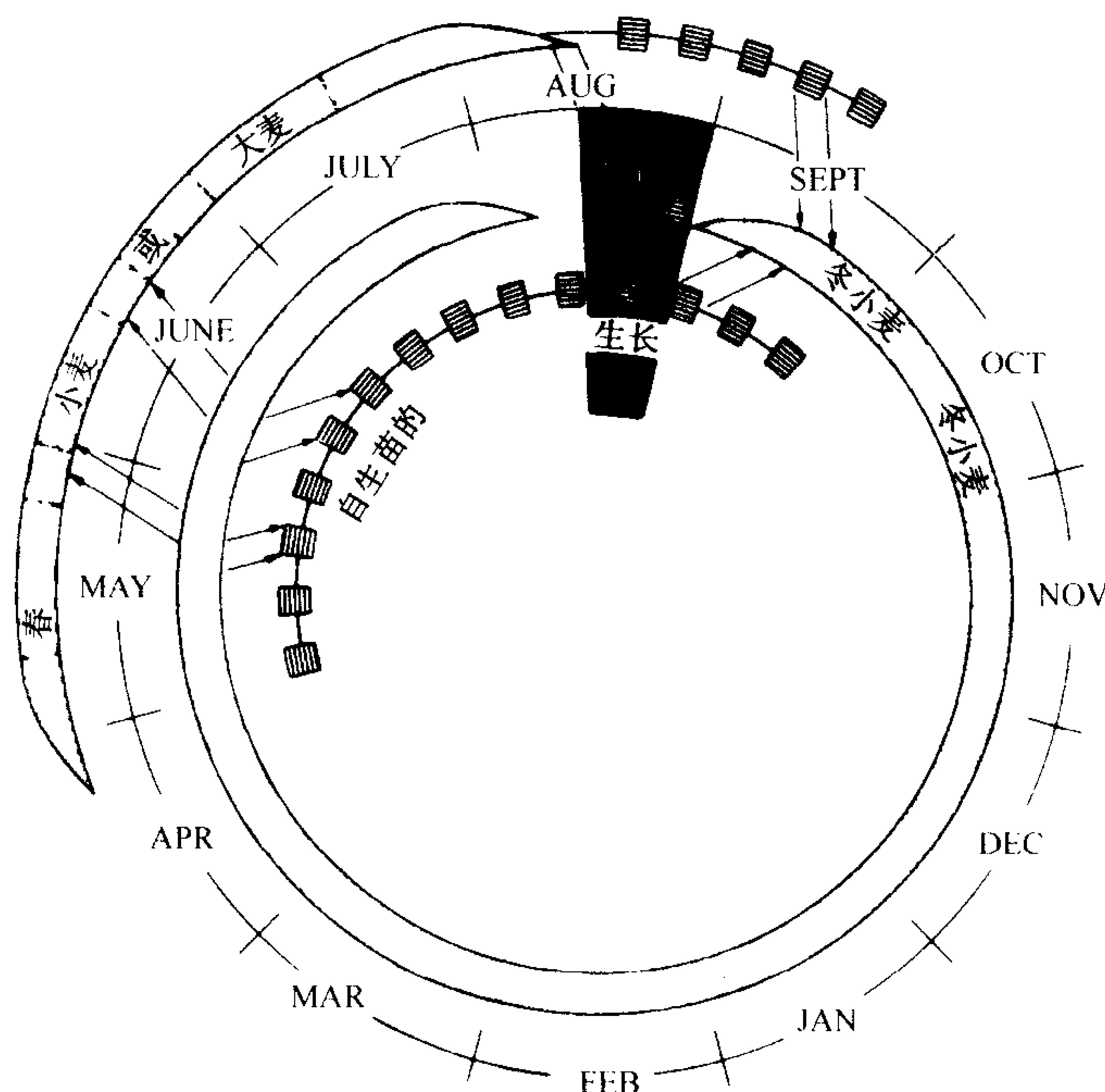


图16.5　小麦线条花叶病害循环。防止冬小麦在秋季的侵染是控制该病的关键：黑色区域，通常可得到有效防治的时期；断续阴影带，存在自生麦苗、早播冬小麦或晚熟春小麦（大麦）；箭头，病毒由随风飘扬的螨传播。本图得到 T. G. Atkinson 的惠允，引自 Matthews (1991)。

经证实，在无易感植物生长的地区破坏病毒的周年病害循环，对于控制寄主范围较窄的一些病毒是十分有效的。在发展中国家，一种主要的粮食作物如水稻传统上均是以复种形式生产，因此实施该种病毒控制措施可能比较困难。热带地区灌溉面积和寒温带地区保护性栽培的增加，限制了生产者对打破病害循环方法的选择。

2. 更改种植日期

幼小植株被感染后对于产量的影响往往更大，同时成年植株对病毒感染的抵抗力更强，同时病毒在其体内移动更缓慢。因此对于有空气传播介体的一些病毒，对播种或种

植日期的选择可能会影响病毒侵染的时间和程度。播种的最佳日期要根据介体迁移时间而定。如果介体迁移早，那么播种日期应晚些。如果介体迁移晚，则提早播种可以让植株在感染前长得足够大而可能变得对病毒较不敏感。图 16.6 表明了提早播种对防治病毒的效果。

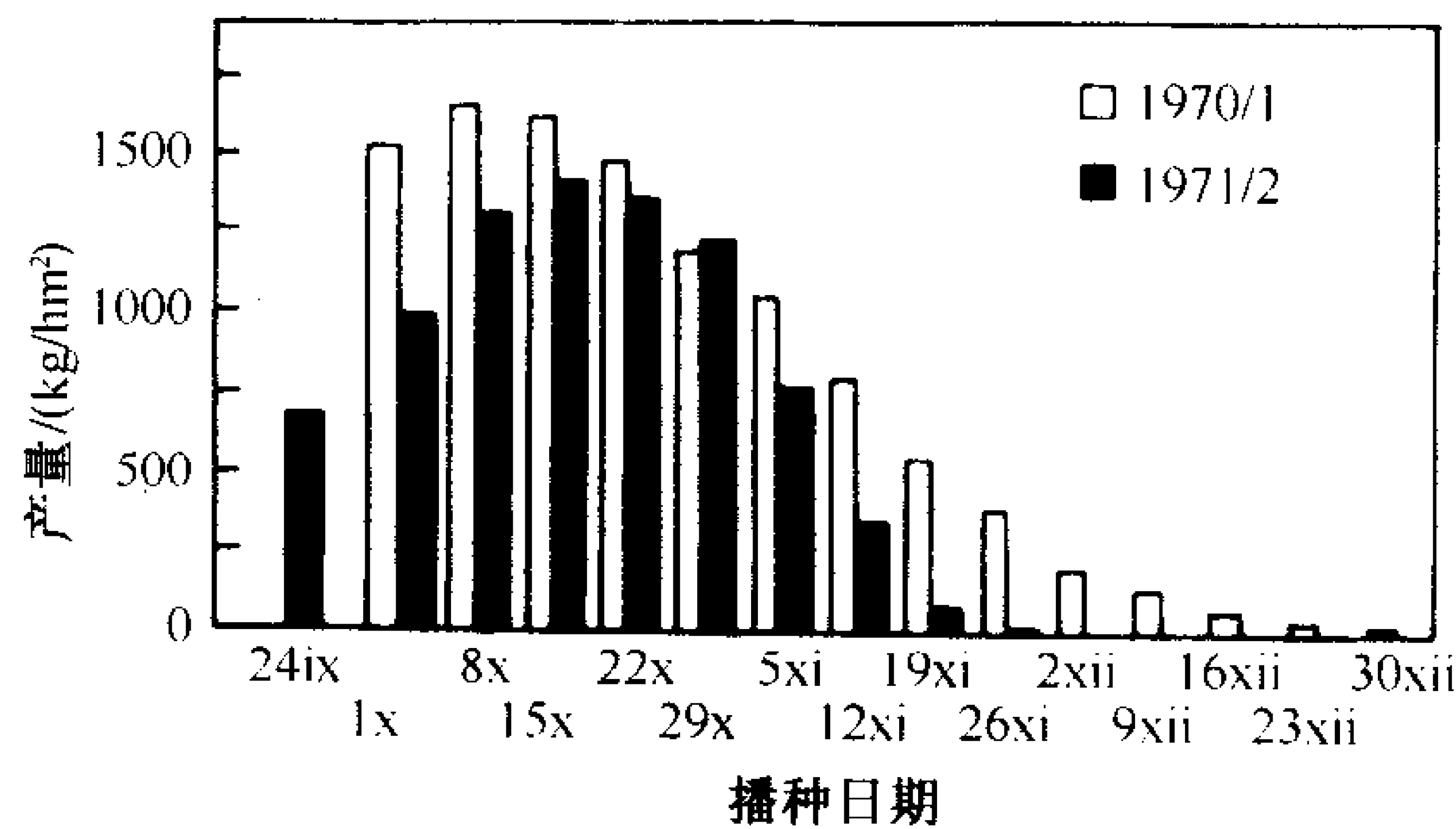


图 16.6 播期对苏丹田间的蚕豆因受苏丹蚕豆花叶病毒（Sudanese broad bean mosaic virus）侵染产量损失的影响；10 月底后播种的小区遭受日益严重的损失。经允许，引自 Abu Salih 等（1973）。

在田间水稻生长密度极大的灌溉地区，水稻东格鲁病（rice tungro disease）是由水稻绿叶蝉（二点黑尾叶蝉）传播的。为了降低其发病率，有关部门鼓励农民在同一时间内种植水稻，让上下茬作物之间留有空闲时间，并避免过晚种植。在印度尼西亚，农民们采纳有关部门推荐的水稻种植日期，使得水稻植株在对即将到来的介体最敏感时期免受感染（Manwan *et al.*，1985；Sama *et al.*，1991）。

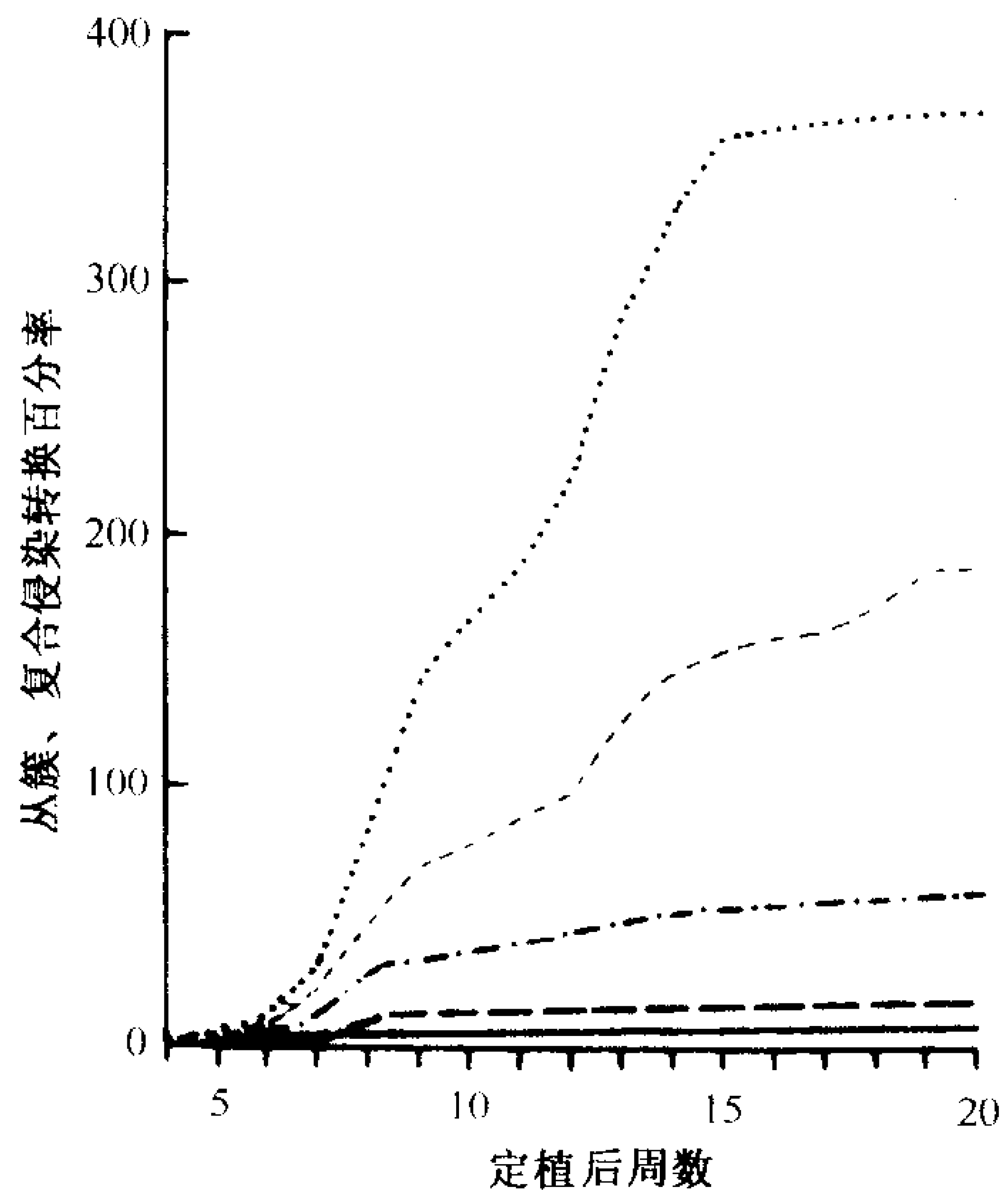


图 16.7 种植密度对花生丛簇病毒病发生的影响。每英亩（1 acre＝0.404 686 hm²）的株数：……，9600；－－，190 50；—·—·—，38 550；   ，78 750；－－ ，160 200. 引自 A′Brook（1964）。对多重侵染转换的推导，经允许，引自 Gregory（1948）。

对于任何一种特定作物来说，改变种植或收获日期在减少病毒侵染方面的效果必须与其他经济因素联系起来。因此，Broadbent 等（1957）发现，提早种植和收获马铃薯确实可降低病毒感染率，但是也同样导致产量方面的经济损失。

3. 植株的空间分布

空间分布较紧密的植株比空间分布较松散的植株来说，免于受到病毒感染的百分率更高，对于这一方面的内容，我们已在第 12 章（第Ⅴ节 A. 3. e）中做了讨论。Hull（1964）和 A′Brook（1964，1968）对花生丛簇病毒病的研究，很好地揭示了种植密度对病毒、病毒的蚜虫介体发生率及产量的实际影响。A′Brook 在几个连续的季节里，对从低到高的较大范围的种植密度进行试验，结果表明，空间分布较好的植株，其蚜虫密度

较高。图 16.7 显示了较高的种植密度下，从簇病感染率显著下降（一些感染被算在复合侵染内）。

虽然较高的植株密度降低了从簇病发生率，但高密度使植株之间产生竞争而使产量下降，同时种子方面的成本也极大地增加。我们的目标就是使种植密度达到既要尽可能地完全覆盖地面，同时又要避免植株之间产生竞争而使产量下降。

一些水稻品种种植密度较大时可降低水稻东格鲁病的发生率，而使稻谷产量显著增加（Shukla and Anjaneyulu，1981），种植密度增加同样可降低甜菜黄化病的发生率（Johnstone *et al.*，1982），因此这一现象可能相当普遍。对于这一现象的可能解释参见第 12 章（第Ⅴ节 A. 3. e）。

4. 除去植株接触空气的部分

为了限制病毒在生长季节后期扩散，一些实施无病毒营养繁殖材料证书计划要求作物在一定的日期前收获。荷兰对种用马铃薯采用该种方法，他们从蚜虫捕获日期确定每一季节的某一时间前，进行起获马铃薯或除去其茎秆（De Bokx，1972）。

饲料甜菜和甜菜在草皮堆内储一冬以提供动物食物。储存到春季时，这种作物的根开始再次长出时会严重感染 BMYV 和 BYV（Smith，1986）。

5. 隔离种植

如果土地和其他因素允许，对于大部分蚜虫传播的病毒病害来说，隔离种植可能会有效地降低发病率。将甜菜地块与感染了两种病毒的甜菜这一大侵染源进行隔离种植，可明显降低前者的发病率（图 16.8）。种用无病毒马铃薯生产常跟其他粮食作物分隔种植。其种植的间隔距离由政府法规确定，同时在某一规定的地区内禁止家庭种植马铃薯。

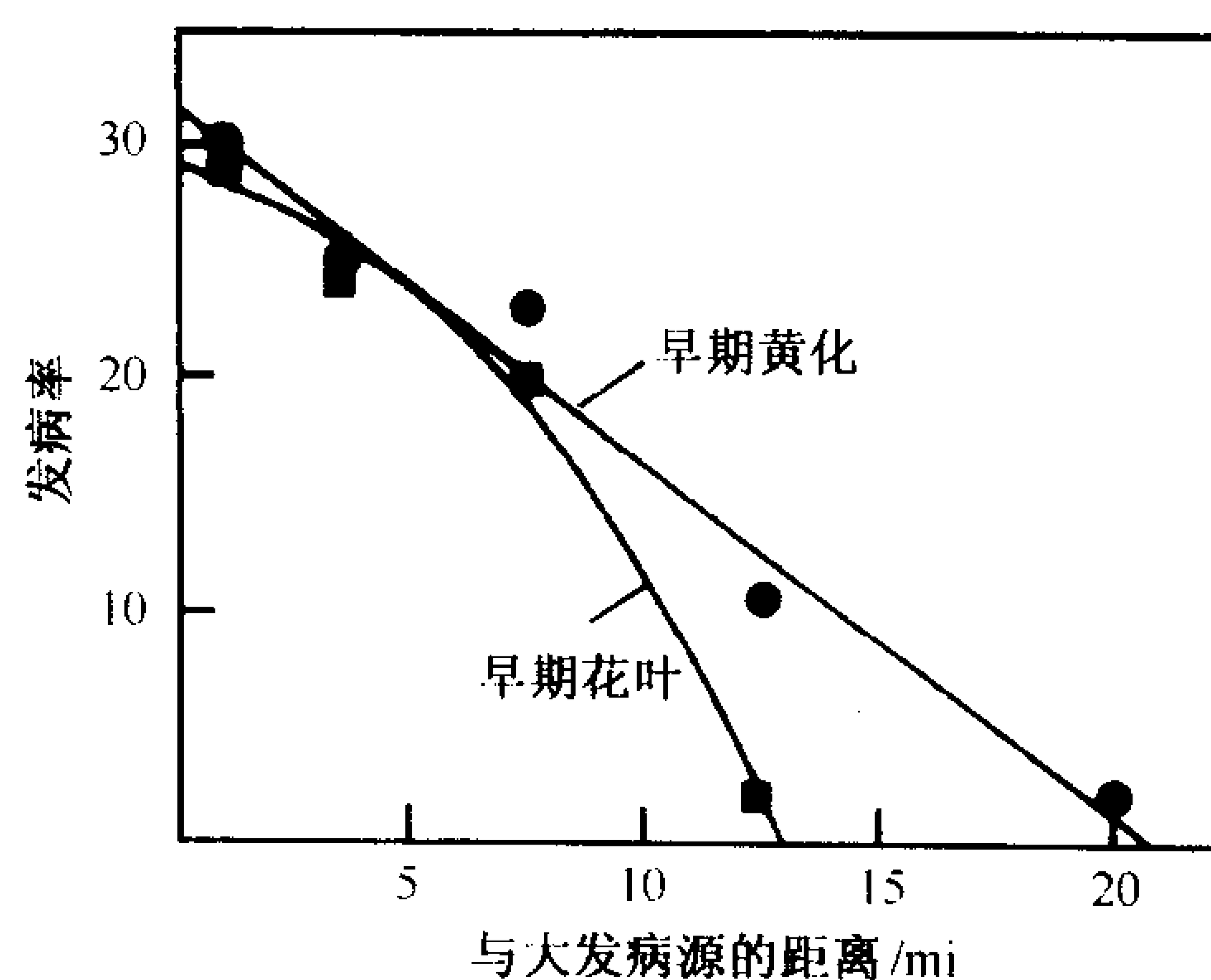


图 16.8 两种蚜传病毒的大侵染源的距离对甜菜早期发病率的影响。该大侵染源是在加利福尼亚的 Sacramento 河谷中 30 000 acre（1 acre=0.404 686 hm^2）发病的甜菜田。承蒙版权所有者（©The American Phytopathological Society）惠允，引自 Shepherd 和 Hills（1970）。

6. 防止长距离扩散

大多数农业发达国家立有法规来控制植物材料进入，从而可防止检疫病虫害进入该国。目前许多国家具有针对检疫某些特定病毒和其介体、有时针对某些特定国家和地区的相关法规。确立和有效地实施检疫法规，是一个复杂的问题，常需考虑政治和经济的因素。对于通过种子传播或果树、母本树等通过休眠繁殖器官传播的一些病毒，采用检疫措施来控制病害发生是很有价值的。

有证据表明染病砧木在世界范围内进行葡萄病毒分布扩散中起着重要的作用（Luhn and Goheen，1970）。同样地，CTV 在世界范围内的扩散也与染病母本树有关，同时该病毒的蚜虫介体的高效率传播加剧了病毒的扩散（图 16.9）。

Kahn（1976）提议无性繁殖材料在国家间的转移，用无菌培养的植物来进行。进

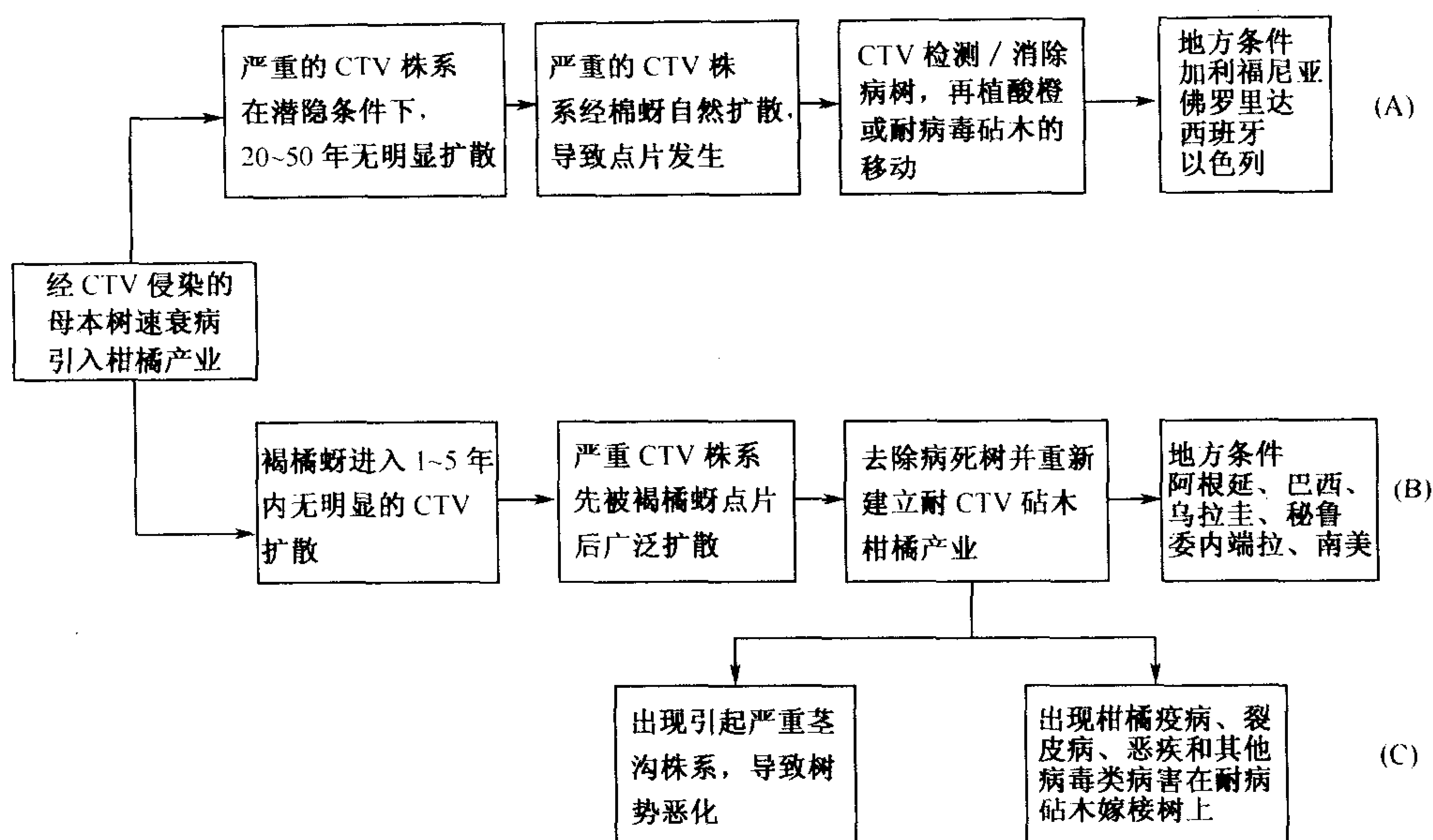


图16.9 CTV在世界各地的引入和流行。(A) CTV以棉蚜(*Aphis gossypii*)为介体在加利福尼亚、佛罗里达、西班牙和以色列的流行；(B) CTV以褐橘蚜(*Toxoptera citricida*)为介体在阿根廷、巴西、乌拉圭等地的流行；(C) CTV引入10～20年后，褐橘蚜群体建立，柑橘产业遇到CTV等病毒和类似病毒病的严重挑战。承蒙版权所有者(©The American Phytopathological Society)惠允，引自Rocha-Pena等(1995)。

口和出口国家或地区间的合作可极大地增加检疫措施的有效性。Hewitt和Chaiarappa (1977)、Khan (1989)、Foster和Hadidi (1998)、Waterworth (1998)就检疫隔离与植物健康间的关系做了回顾，FAO/IPGR制定了种质安全转移的指导方针(Diekmann and Putter，1996)。

实施检疫法规的意义在相当程度上依赖于一个地区原先的植物调移历史。例如，在欧洲国家间频繁交换观赏性植物已存在相当长时间，导致了这些植物在病毒感染方面没有地区性分布差异(Lovisolo，1985)。在另一方面，欧洲植物保护组织发现检疫措施对于欧洲国家未发现的果树病毒来说是很有效的(Ronde Kristensen，1983；Krczal，1998)。

很难对检疫措施在限制病毒长距离扩散中的有效性做出任何客观的评价。由于长期存在着的地理分隔，同时所有作物种类都是进口而来，故几乎可以肯定地说，目前在新西兰已记录在案的所有植物病毒都是在最近200多年间从别的国家引入的。1952年，新西兰首次将病毒列入检疫法规中，到1990年在该国已发现130多种病毒(Matthews，1991)。其中一个例子是RgMV引入，该种病毒是与在多年生黑麦草无性材料上的微小介体一起传入新西兰的(Guy *et al.*，1998)。对该病毒外壳蛋白的研究结果表明，该病毒有两个株系，一个在南部，另一个存在于北方，表明这两株系是分别传入的。

在其他例子中也很好地表明检疫措施可限制病毒长距离的进一步扩散。例如，从南美进口的曼陀罗属植物品种的插条，在美国的检疫隔离期间发现61个插条的37个染有

一系列病毒（Kahn and Monroe，1970）。欧洲对南美马铃薯进行检疫期间发现了南美马铃薯病毒。一个有效的检疫系统要求一套有效的技术设备，即在各种条件下都能对病毒进行检测。而且不仅要检疫重要的进口作物品种，同时也要检疫那些本身并不重要的作物品种，因为它们可能携带有侵染主要作物的病毒。但是，一些病毒通过无脊椎介体进行长距离的自然扩散，可能会抵消检疫措施的作用。

尽管许多国家制定了法规来预防毁灭性病毒进入，但病毒仍可在世界范围内迅速扩散。其中一个例子是甜菜丛根病，最早在意大利北部的波河谷（Po Valley）发现该病。表 16.1 标出了这种病害在许多主要的产甜菜国家的分布（Asher，1999）。为了防止病毒扩散到某一国家，除了法规来控制特定植物品种进口外，还需采取其他措施。例如，自从丛根病在 1983 年传入新西兰后，有关部门对英国甜菜作物进行详细的调查，特别是对生长在接近欧洲大陆地区的甜菜。1987 年首次在 Suffolk 郡发现了 BNYVV 后（Hill and Torrance，1989），立即采取了一些措施来控制该病害的发生。摧毁作物，将土地撒上种子变成牧场，并采取严格的清洁卫生措施。但在 1989 年对 3000 株甜菜的调查发现了两处丛根病的暴发，一处位于 Norwich 附近，另一处位于 Kings Lynn 附近。这两处病害的发生显示出与 1987 年在 Suffolk 郡发生的病害是分开的，但自从那时候起，已有 1600 hm^2 甜菜感染该病毒，这些已发病的田块禁止再种甜菜作物（M. Asher，个人通讯）。另外，还于 20 世纪 80 年代首次在西半球发现丛根病（表 16.1）。因此要控制该病害在世界范围内的扩散，其前景不容乐观。

表 16.1　甜菜丛根病在不同国家首次发现的时间

20 世纪五六十年代		20 世纪 70 年代		20 世纪八九十年代	
意大利	1952	南斯拉夫	1971	匈牙利	1982
日本	1965	希腊	1972	美国	1983
		法国	1973	瑞士	1983
		德国	1974	保加利亚	1983
		捷克	1978	荷兰	1983
		中国	1978	比利时	1984
		奥地利	1979	英国	1987
		罗马尼亚	1979	瑞典	1997
		前苏联	1979		

经允许，引自 Asher（1999）。

第Ⅲ节　控制或避开介体

在控制介体传播病毒前，必须确认传播病毒的介体，但有时很难搞清楚这一点。作为病毒的主要或甚至是唯一介体，通常是一个偶尔的过客而不是一种定居者。例如，褐橘蚜（*Toxoptera citricida*）比棉蚜（*Aphis gossypii*）传播 CTV 的效率高得多（图 16.10）。

控制或避免无脊椎或真菌介体，对于减少由于该类介体传播病毒带来的作物损失是

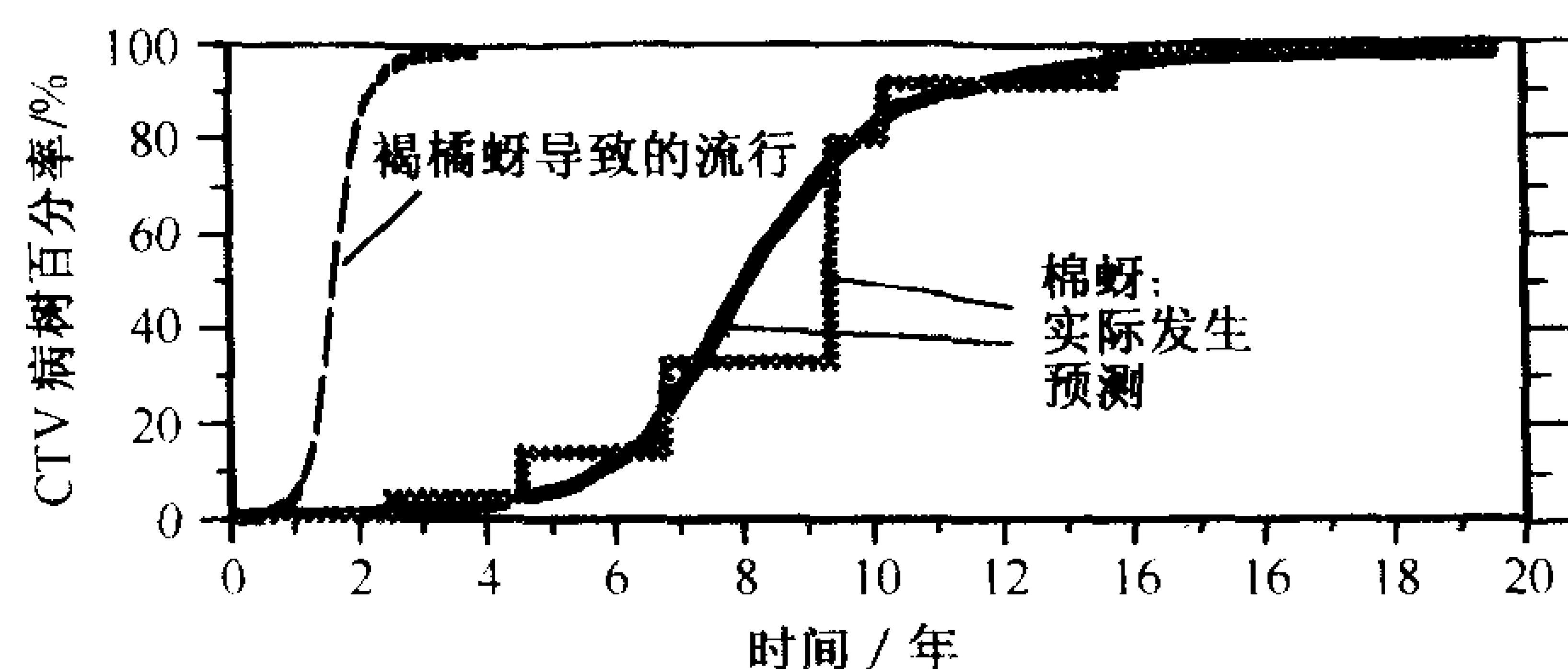


图 16.10 两种传毒效率不同的蚜虫介体在田间传播 CTV 的情况比较。褐橘蚜是高效的传毒介体，其数据来自多米尼加共和国试验田；而棉蚜是低效的传毒介体，其数据来自西班牙、佛罗里达和加利福尼亚，初始侵染水平小于 1%。注意棉蚜传染的阶梯（stairstep）式是由于棉蚜大规模周期性迁移引起。承蒙版权所有者（©The American Phytopathological Society）惠允，引自 Garnsey 等（1998）。

头等重要的事。正是这个原因，对某一特定作物、地块、病毒和介体，需要同时实施一种以上的措施来进行控制。

A. 空气传播介体

1. 杀虫剂

控制植物害虫的杀虫剂种类很多。为了避免昆虫对作物造成的损失，必须将虫口控制在危害水平以下。控制昆虫介体来防止植物受病毒感染，是一个更加困难的问题，因为相对较少的有翅昆虫个体可引起病毒持续扩散传播。触杀性杀虫剂（contact insecticide）除非经常应用才会有效，否则没有多少用途。持效性杀虫剂（persistent insecticide），特别是在植物体内系统扩散的，更有希望控制病毒。通常是有翅蚜将病毒传入植物体内，且在蚜虫第一次吸食植物时就可能将病毒传入植物，故在任何杀虫剂能杀死它们前就可导致植物受到病毒感染。如果是非持久性病毒，当蚜虫取食时会迅速失去侵染性，因此用杀虫剂来杀死它们对于防止作物体外感染病毒没有多大作用。另一方面，如果蚜虫携带的是持久性病毒，那么该蚜虫通常可传染许多植物，故在蚜虫传染第一株植物时杀死它们可减少病毒扩散。

至于病毒在植株体内的扩散，也存在着相同的影响因素。用杀虫剂对非持久性病毒扩散的抑制效果较差，而持久性病毒由于昆虫在植株上需经过相当长的取食时间，故用杀虫剂的效果较好。在使用合适的杀虫剂后，可使马铃薯持久性病毒 PLRV 扩散得到抑制，但马铃薯非持久性病毒 PVY 的扩散却不能得到抑制（Burt *et al.*，1964；Webley and Stone，1972）。

Burt 等（1964）在英格兰通过生长季节的不同时间里喷洒内吸性杀虫剂（systemic insecticide），来探究侵染马铃薯植株的 PLRV 在生长季节的哪个阶段最易扩散。他们的研究结果突出表明了在生长季节的早期，有翅蚜对病毒的扩散具有重要性，同时越早对植株喷洒杀虫剂防止病毒扩散的效果就越好。LMV 等其他非持久性病毒，如 PVY，任何杀虫剂对于防止其扩散没有多大效果。

用内吸性杀虫剂喷洒一道阻挡作物或诱捕作物（trap crop），可降低生长在诱捕作

物里面的作物病毒感染（Gay *et al.*，1973）。如果施用不恰当的杀虫剂，可扰乱寄生在作物上的蚜虫或杀死捕食动物，从而导致增加病毒感染（Broadbent *et al.*，1963）。

作为农事操作的喷洒作业也有一些缺点，额外的作业会对作物造成伤害，而这些伤害就不能获得及时防治。喷洒农药也可对其他作物造成伤害。在种植时施用粒状持效系统性杀虫剂（persistent systemic insecticide）可解决许多问题。如马铃薯等作物，将药物施用器具连在种植器上，然后在种植马铃薯时将药剂按量施入犁沟中。例如，在种植沟中施入或在几周后在植株边沟里施入如涕灭威（aldicarb）和敌灭威（thiofanox）等粒状持效内吸性杀虫剂，可控制蚜虫和马铃薯植株中的PRLV扩散（Woodford *et al.*，1988）。边沟施用效果比在种植沟施用效果差。

与以前的试验相比，在田间试验中，光稳定的合成除虫菊酯（photostable synthetic pyrethroid）PP321可有效控制冬小麦的BYDV、水稻东格鲁病、马铃薯非持久性病毒PVY（Perrin and Gibson，1985）。这一药剂也可有效控制冬季油料种子作物欧洲油菜的BWYV（Walsh，1986）。

内吸性杀虫剂对控制烟草中的非持久性病毒PVY的效果随季节不同而异，这可能与气候因素对蚜虫的数量和迁移影响有关（Pirone *et al.*，1988）。

对于叶蝉来说，它们在取食后被杀死的快慢是病毒控制中的一个重要因素。例如，一些合成除虫菊酯在7 min内杀死病毒介体二点黑尾叶蝉（*Nephotettix virescens*）可防止水稻东格鲁病的扩散（Anjaneyulu and Bhaktavatsalam，1987）。缓释性化学药剂可有效地降低病毒感染。

从使用杀虫剂经济观点来看，预测是否需要使用杀虫剂和确定施药的最佳时间是十分重要的。例如，在中国，冬大麦、冬小麦后茬的两季水稻，使灰飞虱（*Laodelphax striatella*）拥有周年连续的寄主，因此使用杀虫剂的最佳时机是在冬大、小麦幼苗期和第二作水稻生长的早期（Yi-Li *et al.*，1981）。在印度，作物复种模式也很普遍，所以在水稻育苗期施用复合杀虫剂，对控制水稻矮缩病最有效（Shukla and Anjaneyulu，1982）。

在第Ⅲ节A.1中已讨论过病害预测数据是经济施用杀虫剂的一个重要因素。有时长期使用杀虫剂来主要针对一类病毒，会有助于控制另外的病毒。在英格兰的甜菜作物上，主要针对降低或延迟黄化病（BYV和BMYV）发生而适时施用杀虫剂，也是减少该作物上BtMV发生的一个主要因素（Heathcote，1973）。1959年，英国开始了一种喷洒杀虫剂对付甜菜黄化病毒介体的预警计划，计划实施的基础是需要从5月到7月初对作物上蚜虫虫口密度进行观测（Dewar and Smith，1999）。

除了前面提到的问题，还有一些与施用杀虫剂相关的不利于生物学和经济节约的不良后果。这包括：①靶标昆虫对杀虫剂抗性的形成（Georghiou and Saito，1983）；②一旦杀虫剂活性丧失后害虫会再猖獗；③在食物链中对人和其他动物产生的可能影响。

尽管存在着这些问题，目前还是很普遍施用杀虫剂来控制病毒。因为这是生产者控制害虫的方法，他们认为通过它可控制病毒；目前还很少有其他可供选择的防治病毒的策略；预测病害流行很难，所以要采取预防措施；与整个作物的产量相比，杀虫剂的花费相对较低。

2. 喷油

Bradley（1956）和 Bradley 等（1962）的研究结果表明，当带有 PVY 的蚜虫刺吸一层带油的细胞膜时，它们随后的传播病毒能力会大大下降。这些观察结果使人们怀着极大的兴趣去采用田间喷油来控制由蚜虫传播的病毒。与内吸性杀虫剂相比，喷油得到了更多关注，因为它对人和动物都无毒。但是由于存在着各种限制，喷油还没有普遍地商业化应用。

一些研究报道表明，田间试验中，喷油在一系列非持久性病毒和半持久性病毒 BYV 的控制中取得了较好的结果（Hein，1971）。但是，喷油不能防止持久性病毒扩散。喷油还有其他的限制因素，包括对植株带来的可能毒性、油的易挥发性或黏性（De Wijs，1980）、叶片上足够的覆盖面积、雨水或灌溉水冲刷油膜层以及它对粮食生产的商品质量的影响等。

已经证明喷洒矿物油对控制球茎作物，如生长在新西兰的百合和风信子上的病毒很有效（Asjes，1978，1980）。日常喷洒矿物油，可大大降低布列塔尼半岛（Brittany）上种用马铃薯上 PVY 的扩散（Kerlan *et al.*，1987）。在苏丹对番茄采用喷油措施来抑制由白粉虱传播的双生病毒（geminiviruses），取得了很有希望的结果（Yassin，1983）。但在英格兰，喷油不能控制持久性病毒扩散（Walkey and Dance，1979），在俄亥俄，喷油也不能控制甜玉米上病毒 MDMV 的扩散（Szatmari-Goodmann and Nault，1983）。在试验中，将矿物油和拟除虫菊酯结合起来施用对控制 PVY 和 BtMV 的效果，比它们任何一种单独使用的效果都好（Gibson and Rice，1986）。

喷油没有显示出对植株易感性、蚜虫行为，或病毒侵染性有重要影响。当蚜虫刺吸喷洒了矿物油的叶子时，油可以很容易地扩散到其口针整个长度。Vanderveken（1977）概括了这一观察结果和各种实验，Wang 和 Pirone（1996）支持这个观点，即油改变了口针的表面结构或充满了口针，这样限制了病毒粒体吸附（或释放）的能力。矿物油对种类繁多的非持久性和半持久性病毒的干扰，其机制可能是非专化性的，而且不针对扰乱任何特定的病毒与介体间的互作。

3. 信息素衍生物

病毒传播过程受一系列昆虫行为的影响，如离开和飞落在植株上、刺吸和取食、与附近昆虫相互作用和对干扰刺激的反应。这些行为受一系列化学物质的影响，这表明使用这些化学物质可能是控制病毒的一条有效途径（Irwin and Nault，1996）。

在温室进行的实验中，从(E)-β-金合欢烯[(E)-β-farnesene]制成的衍生物和有关的化合物干扰桃蚜（*Myzus persicae*）传播 PVY（Gibson *et al.*，1984）。这些物质可能与矿物油的作用方式相同，因为它们影响脂肪族碳链。在继续研发新的化合物的同时（Dawson *et al.*，1988），这种介体控制方法还仍处于实验阶段。

4. 非化学药剂屏障来对付介体昆虫的侵袭

已调查了对介体迁移到作物上遇到的一些可能的屏障，或用驱避剂来防止其迁移。

一种较高的覆盖作物有时会保护一种套种作物免受由昆虫传播的病毒，如葫芦科植

物有时与玉米套种。Broadbent（1957）发现花椰菜苗床附近若种着窄条大麦（大约3行隔0.3 m）时，可使花椰菜幼苗病毒发生率降低至对照的约1/5，因为十字花科植物病毒不侵染大麦。据推测许多迁飞来的蚜虫都落到大麦上，在其上取食，甚至停留在其上或飞走。如果它们停落在芸薹属（*Brassica*）作物上，那么蚜虫在这些屏障作物上取食丧失使其携带的非持久性病毒。

已有一些报道通过在一些试验作物的地面放置铝箔条来对付蚜虫。当蚜虫接近地面时，这种铝箔反射UV，而反射的UV可起到一种驱避剂的作用。银色反射性的聚乙烯覆盖材料可降低WMV的发生率，且在澳大利亚西部，同时采用杀虫剂和矿物油喷洒对增产没有多大效果，而用这种覆盖材料可使产量增加（McLean *et al.*，1982）。但是这些具反射UV作用的覆盖材料较昂贵，同时在常规应用方面存在着难题，因为它不易在生长季结束后就清除掉，而且禁止采用燃烧方法来销毁它们。

用一条0.5 m宽的黏性黄色聚乙烯膜，以离地面0.7 m的高度围绕着试验地，可降低胡椒由蚜虫传播病毒的发生（Cohen and Marco，1973）。在印度的黄秋葵（okra）上，用一种黄色聚乙烯覆盖材料可显著延迟一种黄脉花叶病毒（yellow vein mosaic virus）的出现（Khan and Mukhopadhyay，1985）。在作物上张网也可能会减少有翅蚜的虫口数和降低病毒感染，从而使作物正常生长。白色粗网在一些条件下可能是最有效的（Cohen，1981）。但是本节中提到的大多数实验结果还没有从实验阶段进入到商业化实际应用中。

5. 植物对介体的抗性

人们越来越增加了培育对昆虫介体具抗性的作物的兴趣，认为这可代替化学杀虫剂。这可归因于各种各样的因素，包括害虫对杀虫剂出现抗性、研发新杀虫剂的费用、人们越来越意识到化学杀虫剂对环境的危害及对天敌的影响。因此人们日益加强了培育对无脊椎动物，也就是病毒介体具有抗性的作物。一些病毒介体，在正常情况下它们本身并不是害虫，但其他的病毒介体，特别是叶蝉和飞虱可能是严重的害虫。在这样的情形下，得到一种具抗性的作物品种可加倍受益，有时可极其明显地提高其生产性状。Jones（1987，1998）对此发表了综述，Barker和Waterhouse（1999）综述了该种策略对黄症病毒属病毒的防治效果。

已从大多数空气传播介体类中发现了抗性资源。表16.2中列举了一些例子。

表16.2 对（与病毒侵染率降低相关的）气传介体有抗性的植物的实例

介体	作物	病毒	文献
蚜虫			
棉蚜（*Aphis gossypii*）	香瓜	黄瓜花叶病毒	Lecoq等（1981）
桃蚜（*Myzus persicae*）	马铃薯	马铃薯卷叶病毒	Rizvi和Raman（1983）
玉米蚜（*Rhopalosiphon maidis*）	大豆	大豆花叶病毒	Gunasinghe等（1988）
叶蝉			
二点黑尾叶蝉（*Nephotettix virescens*）	水稻	水稻东格鲁病毒	Hibino等（1987）

续表

介体	作物	病毒	文献
飞虱			
褐飞虱(*Niloparvata lugens*)	水稻	水稻齿矮病毒	Parejarearn 等(1984)
粉虱			
烟粉虱(*Bemisia tabaci*)	番茄	番茄黄曲叶病毒	Berlinger 和 Dahan(1987)
蓟马			
棉花蓟马(*Frankiniella schultzei*)	花生	番茄斑萎病毒	Amin(1985)
螨			
麦曲叶螨(*Aceria tulipae*)	小麦	小麦条纹花叶病毒	Martin 等(1984)

人们在大多数情况下不太清楚作物对介体具抗性的理论基础，但目前已确定了一些因子。一般说来，控制介体相关的抗性有两种，一种是非选择性的(non-preference)，包括对介体行为的一种不利影响，而导致降低介体定居；另一种是抗生作用(antibiosis)，它对介体生长、繁殖及介体定居后生存产生不利影响。这两种因子并不总是很容易被区别开的。抗性的一些特定机制有：①番茄中具腺的毛状体分泌的黏性物质(Berlinger and Dahan，1987)。②大豆叶片上密集的短绒毛(Gunasinghe *et al.*，1988)。③茄属植物(*Solanum betrhaultii*)上的A型茸毛当其裂开时，以其内含物来诱捕蚜虫，而同一植株的B型茸毛缠住蚜虫，蚜虫会挣扎得更激烈，从而使更多的A型茸毛裂开(Tingey and Laubengayer，1981)。④使介体不能找到冰草属植物(*Agropyron* species)的韧皮部(Shukle *et al.*，1987)，但是这种作用对大麦上一种BYDV的蚜虫介体没有效果(Ullman *et al.*，1988)。⑤干扰介体寻找寄主植物的能力。例如，具银色光泽叶片的葫芦科植物，在田间可使其受到CMV、ClYMV完全侵染的发生时间推迟几周(Davis and Shifriss，1983)。这可能是由于蚜虫介体较少光顾具有银白色叶片植株的缘故，因为这些叶片具有不同的光反射特性。

将植物对介体抗性与其他控制措施结合起来有时可能会有效地控制病毒。例如，在田间试验中，结合施用杀虫剂和对叶蝉介体具中等抗性的水稻品种可有效地控治水稻东格鲁病(Heinrichs *et al.*，1986)。对于完全抗病的品种来说可能并不需要喷洒农药。

应用抗病毒介体品种可能存在着各种限制：①有时这样的抗性无法对抗病毒入侵。例如，抗蚜虫寄主的豇豆没有保护能力来对抗CABMV侵染(Atiri *et al.*，1984)。②如果某一病毒具有多种介体种类，或一种作物易受几种病毒侵染，那么培育一种作物品种来对付所有这些问题实际上是不可行的，除非应用非专化性机制(如被绒毛叶片)。③最严重的问题可能是，随着广泛栽培抗性品种，存在着出现新的介体生物型这种潜在风险性。这种情况就与使用杀虫剂而导致抗药性害虫出现一样。

这种困难在近来对付褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)(BPH)的经历中得到了很好的体现。东南亚从20世纪六七十年代，随着高产水稻品种的盲目推广，使得褐飞虱和由其传播的RGSV成为当时水稻生产中的重要问题。大约在1974年释放了一个对其有显性抗性基因(*bph1*)的水稻品种。大约在3年内，就出现了抗该品种的群体。在1975～1983年，将一个新的隐性抗性基因(*bph2*)应用到一些水稻品种进行生产。这些品种在刚开始的几年中生长良好，但其后随着克服该抗性基因的新飞虱生物型的出现

而又归于失败（Thresh，1988a，1989a，b）。在研究3个褐飞虱（*N. lugens*）无性繁殖个体对具有不同抗性基因水稻品种的适应实验中，Alam 和 Cohen（1998）发现，在大约10年的接触时间中，*bhp1* 和 *bhp3* 抗性基因更易被这些飞虱无性系所克服。但是具有 *bph1* 基因和其他次要抗性基因的水稻品种 IR64，比其他品种具有更长的持久抗性。将抗 BPH 的基因 DNA 标记用于对水稻基因组作图，从而应用在水稻育种研究中（Yencho *et al.*，2000）。

虽然存在着这些困难，同时还有对具介体抗性植物鉴定方面的问题，但可以确定的是，今后会有大量的研究来继续提高和扩大对病毒介体具抗性的作物品种范围。将对介体和病毒抗性结合起来将是今后的目标。

6. 用捕食动物或寄生物来控制病毒

捕食动物和寄生物在抑制蚜虫和其他害虫虫口增长方面无疑起着主要的作用。除了采取害虫综合控制策略如药剂种类选择、种植日期、杀虫剂有计划和有控制地施用等措施外，另一提高害虫天敌作用的潜在策略，就是通过培育将促进自然天敌捕捉害虫能力整合到作物品种中（Botrell and Barbosa，1998）。

这一措施在病毒控制中应用较多。但是采取这一措施在某些条件下需要几个前提。图16.11对此做了解释，这是 Evans（1954）在台湾的实验结果。他在一块花生田的不同地方分别选择一棵植株，并在这些植株上培养少量豆蚜（*Aphis craccivora*）（1头成蚜和5头若蚜）。然后他跟踪观察蚜虫无性繁殖个体的生长和捕食昆虫的出现。

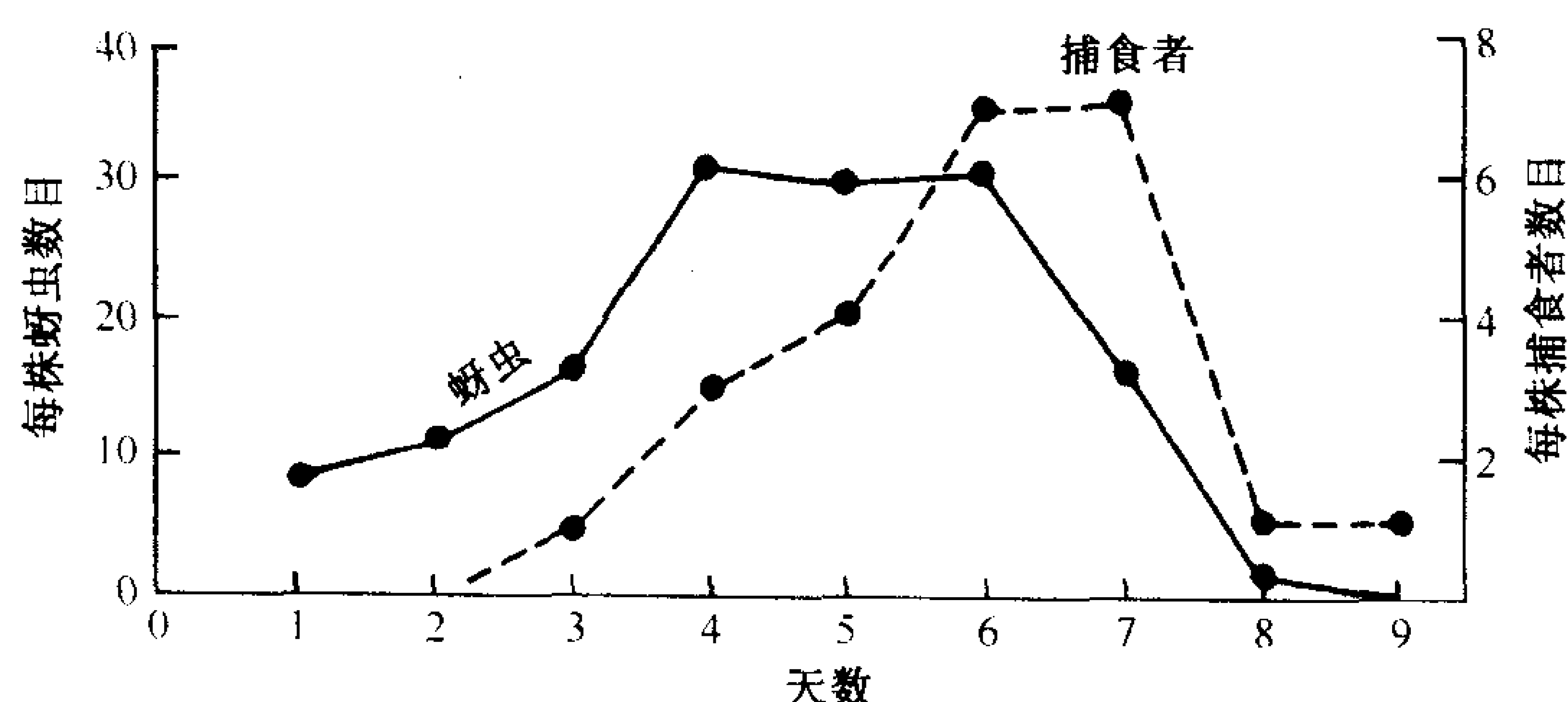


图16.11 花生上的初始蚜虫小群落及其随后被捕食者（predator）毁灭的情况。经允许，引自 Evans（1954）。

在一些情况下，捕食昆虫在抑制病毒扩散中可能起一部分作用，但通常如果它们不在蚜虫迁移早期前出现，那么对于抑制病毒扩散没有多大作用，因为迁移的蚜虫对病毒扩散传播很重要。在西非，对可可病毒的介体粉蚧（mealybug）来说，虽然病毒介体相对固定，但采取引进其真菌和膜翅目的（hymenopterous）寄生物，可成功控制 CSSV（Thresh，1958）。

B. 土传病毒介体

控制线虫和真菌传播病毒方面的许多研究工作大都集中在使用化学药剂对土壤进行

消毒上。但是一些因素使得要实现广泛和长期控制该类病毒变得不太可能：①需要处理的土壤量太大；②即使达到了99.99%的死亡率，还可使大量介体存活；③所用的一些化学药剂在某些国家是被禁用的，同时类似的禁用药剂种类还可能进一步扩大。在任何情况下，用化学药剂控制病毒只有对高经济回报作物或那些多年生作物来说，在经济上是合理。但是控制线虫的最新研究进展可能对由线虫传播的病毒控制是适用的，同时也可适用于控制由真菌传播的病毒。

1. 线虫（Barker and Koenning，1998；Satapathy，1998）

控制线虫有4个基本策略：①根除或避开；②降低最初的虫口密度；③抑制线虫繁殖；④限制当前或下一作物受损。在每种策略中，还有各种各样的战术来降低线虫的虫口密度或将线虫对植株的干扰降到最低。至于其他介体，具有一种可以确定潜在病毒介体种类的方法是十分重要的，这在分子生物学诊断方面已有了相当大的进展（Hyman，1996）。在这一节里，我们将简要地介绍这些控制策略，并对已应用的控制线虫传播病毒的措施进行小结。

根除或避开线虫常通过检疫来完成。但是，对于世界范围内大批量交易根用蔬菜和生根植物来说，实施这一措施是很困难的。

降低线虫的最初虫口密度有几种方法，包括栽培途径，如采用无线虫的根茎种植、用非靶线虫寄主进行轮作、对于线虫传播且也经杂草种子传播的病毒进行杂草寄主控制、采用抗靶线虫的植物品种等。同样可用化学杀线虫剂、生物学技术如引入抗线虫生物因子和有机改良剂（organic amendment）等。采用抗线虫作物品种可降低线虫虫口密度。近年来已开展转基因抗性作物研究来对付线虫（Lilley *et al.*，1999）。

可通过化学药剂、有机改良剂、一些自然和转基因抗性特点来降低线虫繁殖。

耐线虫作物品种可减少由于线虫取食造成的损害，但不会减少病毒感染的概率。

总之，将线虫影响降至最小的最佳途径是整合上述策略和技术来阻止线虫危害，同时向有利于抗线虫生物体和土壤环境条件方面促进（Stirling，1999）。线虫虫口密度的下降可使植物受其携带病毒感染的概率下降。

控制线虫传播病毒的主要方法是杀线虫剂的使用。杀线虫剂可分为两类：熏蒸剂（如溴甲烷，methyl bromide）和非熏蒸剂（如涕灭威，aldicarb）。这些控制措施在原则上应该是有效的。线虫的移动和扩散普遍较慢，因此与空气传播介体相比，用一种处理方法对付线虫的有效期较长。在另一方面，正如Sol（1963）所指出的，在一个相当高的死亡率下，仍可以出现侵染性线虫。从深80～100 cm取得土壤样品中，其所含线虫可使植物感染TRV。在对土壤进行熏蒸时，线虫会跑到土壤深处，过后又可移动到已熏蒸过的土壤。

Harrison等（1963）在英国南部的不同地点的田间试验中，在夏季按1 kg/10 m^2 施用熏蒸剂滴滴混剂（dichloropropane-dichloropropene，D-D）或溴甲烷，可杀死土壤中99%以上的裂尾剑线虫（*Xiphinema diversicaudatum*）。这种处理方法可有效地防止ArMV侵染草莓。将草莓种植到经熏蒸过的土壤中并在1～2年后进行检查，发现这两种化学药剂都可将最深达70 cm的土壤样品中的线虫杀死。熏蒸后的病毒发生率与存活线虫的数量紧密相关。

Murant 和 Taylor (1965) 以及 Taylor 和 Murant (1968) 的研究结果表明，单一的土壤熏蒸剂 D-D 或五氯硝基苯（pentachloronitrobenzene，quintozine）可防止由逸去长针线虫（*Longidorus elongatus*）携带的 TBRV 和 RpRSV 对草莓的侵染。五氯硝基苯更好一些，因为它对植物生长没有明显的影响。由于逸去长针线虫在栽培作物和杂草中的寄主范围很广，同时它在无食物来源的土壤还能生存较长时期，因此用轮作方法来根除线虫是不可能的。所以控制由该线虫传播的病毒的最佳方法可能就是采用化学药剂处理土壤。

目前，对于控制 GFLV 的介体——标准剑线虫（*Xiphinema index*）的唯一有效方法是土壤熏蒸处理。如果采用土壤熏蒸方法来进行适当的治疗，葡萄园可在连续 15～20 年时间内不受线虫危害（Raski *et al.*，1983）。在重新种植葡萄前进行土壤熏蒸以杀死所有线虫是十分重要的。这一处理过程应当与用除草剂处理老葡萄树结合起来，这样可在熏蒸上层土壤前，消灭葡萄树老根和在其上寄生的线虫。

目前在寻找线虫抗性方面的研究工作很少。但是 Bouquet (1981) 报道了对标准剑线虫（*X. index*）的抗性和圆叶葡萄（*Vitis rotundifolia*）免于病毒侵染而发生葡萄扇叶病。而且，上面也已提到用转基因方法使植物对线虫具抗性。

2. 真菌

对于真菌传播的病毒，两大农业方面的状况很重要：一是营养或水生生态系统；二是田地。主要的控制措施都是使用化学药剂，化学药剂可分成 3 类：①表面活性剂、重金属和有时在营养或水生系统使用的杀真菌剂；②土壤改良剂和杀真菌剂控制土壤中的真菌介体；③土壤部分灭菌剂（sterilant）或消毒剂（disinfectant）来减少土壤中真菌介体的游动和休眠孢子。表 16.3 列出了上述 3 种方法的几个应用例子。

表 16.3　控制植物病毒的真菌介体的一些化合物

病毒	载体	控制因子	有效浓度	文献
营养或水培				
豆瓣菜黄斑病毒(WYSV)	马铃薯粉痂病菌(*S. subterranea*)	锌	>0.05 mg/L	Walsh (1992)
莴苣巨脉病毒(LBVV)	芸薹油壶菌(*O. brassicae*)	Bavastin	0.06 g/L	Tomlinson 和 Faithfull (1979)
LBVV 与莴苣环坏死(lettuce ring necrosis)	芸薹油壶菌(*O. brassicae*)	紫外线	取决于流量	Gharbi 和 Verhoyen (1993)
土壤改良和杀菌剂				
马铃薯帚顶病毒(PMTV)	马铃薯粉痂病菌(*S. subterranea*)	硫酸锌(锌矾)	1320 kg/hm²	Cooper 等 (1976)
烟草坏死病毒(TNV)	芸薹油壶菌(*O. brassicae*)	克菌丹(Captan)	1 g/kg 土壤	Thomas (1973)
甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)	甜菜多黏菌(*P. betae*)	氟啶胺(Fluazinam)	10～50 mg/L	Uchino 等 (1993)
土壤处理				
莴苣巨脉病毒(LBVV)	芸薹油壶菌(*O. brassicae*)	氯化汞(升汞)	0.05%	Grogan 等(1958)
莴苣巨脉病毒(LBVV)	芸薹油壶菌(*O. brassicae*)	Jet 5	2%	Walsh (1998)
小麦梭条花叶病毒(WSSMV)	禾谷多黏菌(*P. graminis*)	溴甲烷(甲基溴)	1.5 ml/L	Slykhuis (1970)

一般来说，化学药剂处理土壤对于控制以真菌作为传播介体的病毒的侵染，一直不太成功。例如，各种杀真菌剂不能控制由禾谷多黏菌（*Polymyxa graminis*）将BaYMV传到冬大麦上（Proeseler and Kastirr，1988）。在温室试验中，一些杀真菌剂可防止甜菜受BNYVV感染，但在田间即使在使用这些杀菌剂频率较高的情况下也没有取得效果（Hein，1987）。在实验室中，芸薹油壶菌（*Olpidium brassicae*）的卵孢子对一些杀真菌剂和表面活性剂很敏感（Tomlinson and Faithfull，1979）。Walsh（1998）发表了使用化学药剂控制真菌介体的综述文章。

一些小麦品种在田间显示出对SBWMV的抗性。目前还未弄清这种抗性机制，但部分原因可能是这些品种对该病毒的介体禾谷多黏菌（*P. graminis*）具有抗性（Lapierre *et al.*，1985）。尽管这些真菌介体传播的病毒在农业生产上很重要，但由于培养这种介体很困难，故很少开展对抗介体（真菌）的谷类作物培育方面进行研究。

第Ⅳ节　防止植物受到系统性病害侵染

即使存在着侵染源且介体很活跃，仍还有第三种方法来控制病毒即防止感病植株发展成系统性病害。基本上有3种途径来保护植株，即采用弱病毒株系（称交互保护或弱株保护）及采用化学药剂和遗传学保护（常规抗性和转基因抗性）。前两种途径将在这一节中进行讨论，后一种遗传学保护将在后面两节中讨论。

A. 弱毒株系保护（交互保护）

侵染植物后引起轻微症状的一种病毒株系（保护株系，也叫弱毒株系、减毒株系、低毒株系或无毒株系）可保护植株免受挑战病毒株系的侵染（参见第17章第Ⅱ节C.4）。因此可有目的地让植株感染一种弱毒株系，来保护其免受严重的病毒入侵。这种方法最早由McKinney（1929）报道，他发现TMV的一种"绿色"株系系统性侵染的烟草植株，可免受别的株系侵染而产生黄花叶症状。

但这类方法在很困难的情况下作为一种有利于植株生长的措施可能是值得的，但在实际生产中却不被推荐使用，理由如下：①所谓的弱株系常导致作物产量下降5%～10%；②感病植株可能作为一种病毒源，这样会使更多的感病作物品种或类型也受到感染；③病毒的优势株系在一些植株上会变成一种引起更严重症状的病毒类型；④当一种没有亲缘关系的病毒侵入作物时引起的混合侵染可能导致严重的病害；⑤对于一年生作物来说，引入弱毒株系是劳动强度高的农事操作；⑥弱毒株系的基因组可能与其他任何病毒的基因组进行重组，从而产生一种新病毒。

尽管存在着上述问题，但该方法还是得到了成功的应用，至少在某一时间和对某些作物来说。获得一种合适的弱毒株系分离物须遵循下列程序：①与平常得到的分离物相比，它在所有栽培作物寄主上产生的症状都应当更轻微，且不会改变作物产品的市场品质；②它应使作物受到系统性感染，即使不是全部植物组织，也须侵入到大多数组织；③遗传学上应稳定，且不会产生使植株发病严重的类型；④介体传播该株系应较难，从而可限制其向其他作物无目的地扩散；⑤应当保护植株免于受到最大可能范围内的挑战病毒株系的侵染；⑥这种保护性接种物的生产、纯度检测、供应和应用等应容易操作且

便宜。

弱毒保护株系是从自然发生的变异体中产生，从随机发生的突变或从强致病株系的直接突变中得到。

Broadbent（1964）建议，与早期感染相比，由于受到晚期 ToMV 感染的温室番茄常引起茄果品质的严重下降，所以经常遭受该类损失的生产者应当在植株生长早期对其接种弱毒株系进行保护。Rast（1975）获得了在番茄中无症状显示的 ToMV 亚硝酸突变体（nitrous acid mutant）。在欧洲国家、加拿大、新西兰和日本等，有一段时间广泛地用该弱毒株系来接种（番茄）幼苗。但在商业化生产中，具有抗 ToMV 基因或具有复合基因（multiple gene）的耐 ToMV 作物品种的应用，已大量代替了用弱毒株系接种幼苗的方法。

交互保护在世界范围内的成功例子是 CTV 的应用，CTV 是柑橘果园中的一种最重要的病毒。20 世纪 20 年代，该病毒从南非引入南美后，使阿根廷、巴西和乌拉圭等国许多地区的柑橘生产几乎遭到毁灭性的破坏。Costa 和 Muller（1980）详细介绍了将巴西 CTV 弱毒株系分离物接种柑橘植株上，成功应用交互保护的情况。1980 年前 Pera 橙子树在巴西有 800 多万棵，而这种方法在这些橙子树上取得了极大的成功。通过连续无性繁殖，大多数植株个体都继续保持这种保护作用。但是在佛罗里达地区以酸橙为砧木的巴伦西亚甜橙树上，通过连续 8 年对 4 个弱毒分离物对强致病分离物 CTV 的抑制能力评价来看，可以发现未用弱毒株系进行保护的甜橙树有 85%出现了严重症状，经弱毒株系保护的甜橙树也有 75%出现严重症状（Powell *et al.*，1992）。同样的分离物在以酸橙为砧木的红玉葡萄柚上起到的保护效果较好（Powell *et al.*，1999）。因此交互保护作用与接穗砧木组合有关，且也与植物和弱毒株系是否兼容有关。科学工作者一直在继续寻找更弱的病毒株系（Muller and Costa，1987；Roistacher *et al.*，1987），同时这种交互保护方法也在别的国家开始采用。

有效的交互保护方法也正在应用于别的病毒和作物，其中包括番木瓜的 PRSV（Yeh *et al.*，1988；Gonsalves，1998）、辣椒的 TMV（Tanzi *et al.*，1986）和小西葫芦的 ZYMV（Walkey *et al.*，1992）。在西非国家加纳，用引起可可肿枝病的病毒弱株系进行交互保护，原则上能使这种可可病害在一定程度上得到控制（Posnette and Todd，1955；Hughes and Ollennu，1994），但是遇到的各种困难使得这种防治措施未能得到有效实施（Fulton，1986）。尤其是这种措施与通过清除受到侵染的树木来处理所有已知病毒病的暴发的目标不相符合。清除所有病树已不再是可行的措施，因此在加纳的一些可可肿枝病为害最严重的地区有了采用交互保护的可能性，况且这些地区已放弃了其他控制病害的措施（Matthews，1991）。

第 10 章（第Ⅳ节）介绍了在了解寄主通过转录后基因沉默而对病毒侵染做出反应方面的最新进展。很可能是弱毒株系的交互保护起动了这种防卫系统，从而抵抗强致病株系的重复侵染。了解了这一点，则可推断弱毒保护株系的核苷酸序列应与后面侵染的强致病株系相似。对不同地点、不同时间采集到的 CTV 分离物的序列分析表明，在佛罗里达和西班牙应用的弱毒株系与一大批分离物的序列都很相似（Albiach-Marti *et al.*，2000），这是出人意料的，因为 CTV 的最初两个测序的分离物存在 60%的序列差异。

但是，也可能在一些使用弱毒保护株系的情况下，别的机制如对复制位点的竞争等发生了作用。

B. 卫星介导的保护作用

卫星病毒和卫星 RNA 在第 14 章第Ⅱ节做了介绍，作为潜在的生物防治因子，卫星病毒和卫星 RNA 可分成 3 类，即增强辅助病毒引起的症状、对辅助病毒致病效果无影响及可降低辅助病毒引起的症状，其中第三类具有控制病毒病的潜力。这方面的很多工作集中在 CMV 卫星的研究上。

Tien 等（1987）通过在 CMV 分离物中添加经过选择的卫星 RNA 而获得了 CMV 的弱毒株系。经试验表明，在中国许多地区控制了辣椒上的 CMV，从而提高了产量。防治效果依赖于接种时间、接种植物百分率、田间已存在的 CMV 强毒株类型和辣椒品种等因素。

Wu 等（1989）用含有或无卫星 RNA 的 CMV 弱毒株系对烟草和辣椒进行接种，并比较了相应的保护效果。结果发现含有卫星 RNA 的接种物可增强保护作用。在温室进行控治番茄上的 CMV 的实验中也得到了相似的结果。田间试验中，对蚜虫传播的病毒，这种保护作用可以保持（Montasser *et al.*，1991）。Gallitelli 等（1991）对此做了进一步的研究，他们用含有一种引起非坏死症状的卫星（non-necrogenic satellite）的 CMV S 株系即 S-CARNA5，接种了几个品种的几百株番茄幼苗。在春天时幼苗期将其移植在意大利南部一个农场里，那里预期发生番茄坏死病（tomato necrosis disease）的严重流行。一旦该病害开始流行，则将毁灭一些地块中 100%的植株。在这样的地块如果有接种植株，那么这些植株对该病害的防御能力几乎为 100%，而未接种的植株中将有 40%发生致死性的坏死。受到保护的植株的结果量是对照的 2 倍。在日本（Sayama *et al.*，1993）和中国（Tien and Wu，1991）采用卫星病毒来使番茄抵抗 CMV 的侵染，在美国则用它保护辣椒和甜瓜免受 CMV 的侵染（Montasser *et al.*，1998）。

一个模型表明，接种含有一种弱毒卫星 RNR 的 CMV 后，再挑战接种含有或不含 CMV 的一种强毒性卫星分离物，可干扰该（CMV）强致病株系的复制和症状产生（Smith *et al.*，1992）。

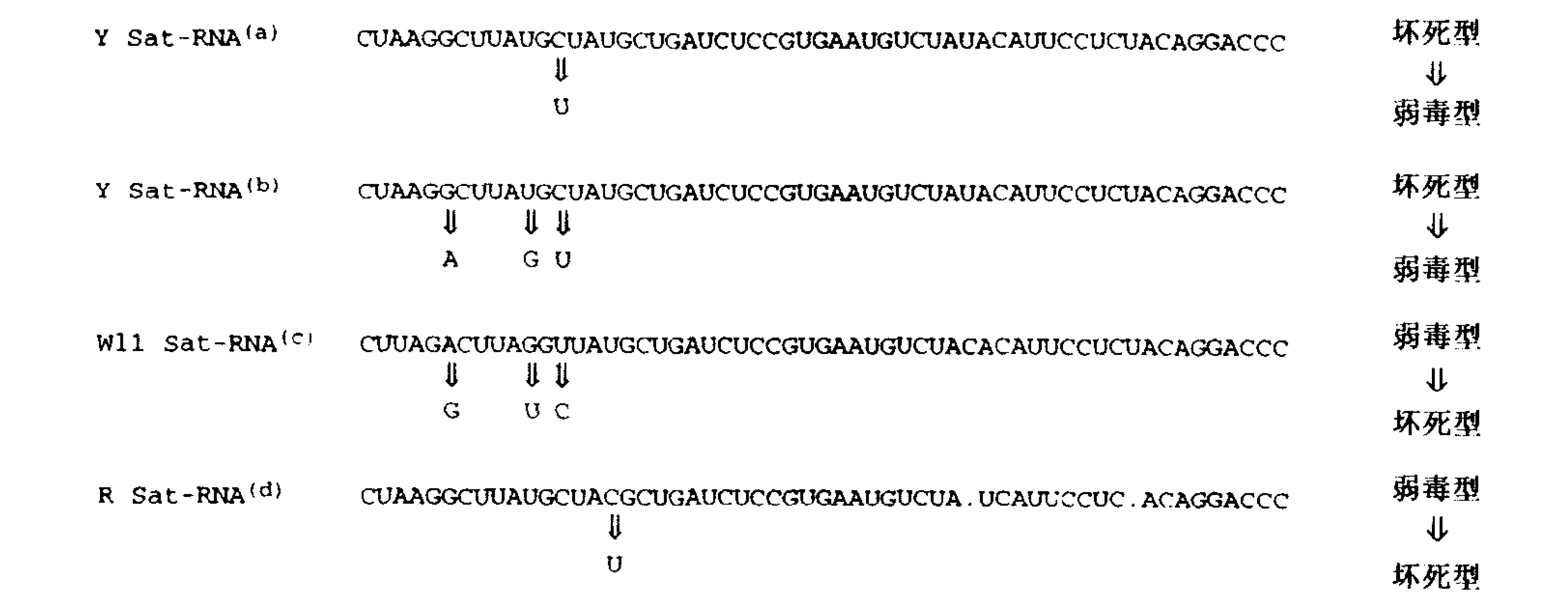


图 16.12 55 个坏死和非坏死型卫星 RNA 3′端序列的比对。箭头表示坏死决定子的位置。承蒙版权所有者（© The American Phytopathological Society）惠允，引自 Jaquemond and Tepfer（1998）。

但是，人们一直在考虑使用病毒卫星作为生物控制因子的持久性。CMV 卫星有一大类引起坏死和其他致病性强的株系（Jacquemond and Tepfer，1998）。CMV 的一种良性卫星通过普通烟进行传代，使得该卫星迅速突变为致病的形式（Palukaitis and Roossinck，1996），而且一个或几个碱基的突变可使一种不引起坏死症状的株系变成一种引起坏死症状的株系（图 16.12）。CMV 卫星的坏死变异体比非坏死变种的致病力强（Escrui *et al.*，2000），但是，当它们抑制辅助病毒积累的能力强于非坏死变种时，则这种坏死变种经蚜虫传播的效率降低。

C. 抗病毒化学药剂

1. 抗病毒的化学药剂

许多研究工作者做了相当大的努力试图找到病毒抑制剂来抑制病毒的侵染和增殖，就像杀真菌剂保护作物直接抵抗真菌侵染一样。

但在商业化生产范围内至今还没有应用抗病毒药剂来成功控制病毒病。主要的困难是：

（1）一种有效的化学药剂必须能抑制病毒侵染和增殖，但又不损害植物。这是一个首当其冲且又是一个主要的难题。病毒复制与植物细胞病变关系很紧密，故任何阻止病毒复制的化合物很可能对寄主造成伤害。

（2）如果一种抗病毒制剂要防止植物因病毒的无脊椎动物介体取食而造成病毒感染，则需要其系统地分布到整个植株。

（3）在植株体内系统分布的一种抗病毒制剂，其在植株体内的活性需要保持一个合理的时期，否则若需要经常进行这样的保护在生产上不太实用。目前许多具有抗病毒活性的制剂在植株体内一段时间后就往往失去了原有的活性。

（4）对于许多作物和病毒而言，抗病毒制剂应在较经济的价格水平进行大规模生产。但对于像温室兰花这样的一些生产规模相当小、而经济价值高的作物而言，这一点难以做到。

（5）在许多作物上使用的化合物应通过食品和药物法规的安全检查要求。许多在实验中应用的化合物，在这类法规的规定下难以得到批准。

许多从植物和其他有机体分离得到的物质及一些复合有机化合物已被证明具有抵抗植物病毒的活性。几乎所有具有抑制病毒侵染的药剂，只有在叶片受病毒感染前或感染后的很短时间内使用，才能发挥其抑制病毒侵染的作用。其中的一个例子是从大雄疫霉大豆专化型（*Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*）制备葡聚糖，这种药剂可通过一种新的但目前还未知的机制抑制几种病毒的侵染（Kopp *et al.*，1989）。其田间的研究工作分别由 Matthews（1981）、Tomlinson（1981）、White 和 Antoniw（1983）及 Verma 等（1998）做了介绍。

目前科学工作者们已开始广泛研究核酸中嘌呤和嘧啶碱基的合成类似物，且一直在寻找这种类型的病毒抑制化合物（Dawson and Boyd，1987a）。替代的三唑衍生复合物（substituted triazole），即 4(5)氨基-1H-1,2,3-三唑-5(4)羧酰胺[4(5)-amino-1H-1,2,3-triazole-5(4)- carboxyamide]，可以看作是一种替代的咪唑衍生物的氮杂类似物（aza

analog)，而咪唑衍生物在一些系统中已知是嘌呤环的前身。这种化合物显示出对一些植物病毒的抑制活性，但抑制效果不如 8-氮鸟嘌呤（8-azaguanine）明显。Matthews（1953c）提出这种化合物的核糖核苷有可能作为一种抗病毒因子。随后发现这种化合物在实验动物病毒系统中具有广谱的抑制活性，被命名为病毒唑（virazole）（Sidwell *et al.*，1972）。病毒唑即三氮唑核苷（ribavirin）已在各种植物与病毒组合中受到了研究。例如，用该化合物对烟草植株进行预处理，可以使植株推迟或免于受到 TSWV 的侵染（De Fazio *et al.*，1980）。病毒唑可降低栽培植物组织中的 CMV 和 AMV 的浓度。但是，通过茎尖组织培养可以得到无病毒植株，不管培养基中是否含有病毒唑（Simpkins *et al.*，1981）。另外一些病毒抑制物质被加入到各种培养基中，企图提高茎尖培养得到无病毒植株的效率。但这种方法还未普遍采用。

2. 用化学药剂抑制病害症状出现

有一段时间，人们对使用一些内吸性杀真菌剂来减轻病毒病症状很感兴趣，而不管这种处理方法是否必定会对植物叶片中的病毒数量减少有效。有关的杀（真）菌剂（如苯菌灵 Benlate 和 Bavistin）在水溶液中分解，产生甲基-2-苯并咪唑氨基甲酸酯（methyl-2-benzimidazolecarbamate）[即 MBC，多菌灵（carbendazim）]。有报道说这种内吸性杀（真）菌剂具有类似细胞分裂素的活性，虽然与激动素相比活性水平较低。将 MBC 作为一种土壤浸液应用，可显著抑制感染 TNV 的烟草植株叶片上的症状（Tomlinson *et al.*，1976）。但是这类化合物或其他具有相似作用效果的化合物还没有进入商业化应用。

用促进植物生长的根际细菌（PGPR）处理感染 ToMV 的烟草植株可降低其受害的严重性（Murphy *et al.*，2000）。这暗示此化合物应成为控制烟草 ToMV 综合措施中的一个组成部分。

可以看到，在一些案例中，氮肥的过量使用可抑制病毒病症状，但病毒浓度却没有下降。

第Ⅴ节　对植物病毒的一般抗性

A. 寄主反应的种类

寄主植物的遗传组成对某一特定病毒的接种效果具有深远的影响。表 10.1 将寄主植物反应种类进行了定义，第 10 章中介绍了寄主反应的分子生物学方面的内容。图 16.13 表示了单个孟德尔基因（Mendelian gene）所具有的对病害反应的显著效果。某一特定寄主种类或品种对某一特定病毒反应的确定，总被认为是临时性的。在病毒原种培养过程中可形成一种病毒新的突变体，或在自然状态下发现一种新的病毒株系，而这种新的病毒株系可引起植物体内一种不同的反应。这种现象可以特别应用于非寄主免疫。例如，几十年来人们认为马铃薯品系 USDA41956 对 PVX 免疫。但此后出现了一种侵染该基因型的病毒株系（Moreira *et al.*，1978）。

不管怎样，长时间持久的免疫力在自然状态下很可能经常发生。有人指出，像长期

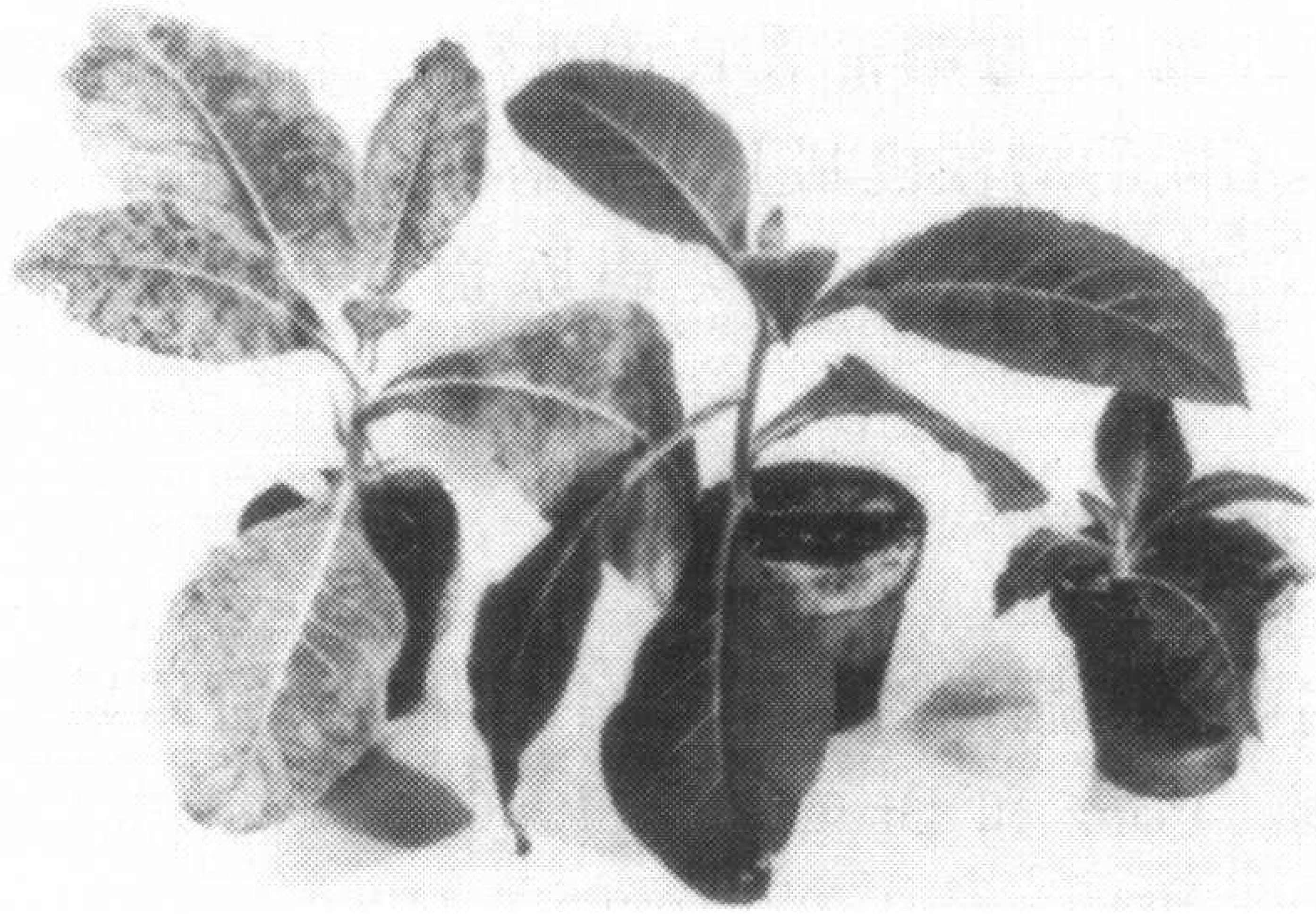


图 16.13 两个烟草品种对源于番茄的 TMV 株系侵染的反应。左：白肋烟显示典型的系统花叶；中：Warnes 烟草产生局部坏死斑；右：F_1 杂种（Warnes ♀× White Burley ♂）显示局部坏死斑和系统坏死和矮化。经允许，引自 Alatthews（1991）。

生长的植物如树木，及自然状态下在某一地区占统治地位的植物种类如草场牧草和具侵占性杂草等，这些植物与别的植物种类相比，需要形成更强的抵抗致死性细胞寄生物的能力。对于病毒感染，这些植物种类也需比别的植物具有更强的抵抗力，但是这方面的实验证据很少。

过去认为对某一特定病毒免疫的许多植物，实际上可能受到了该病毒侵染，但它们具有抗性，并表现出如表 10.1 列出的那种过敏性。与这种免疫有关的病毒的移动蛋白，在某种特定植物中是有缺陷的，使病毒复制只局限在最初侵染的细胞中。这种现象可以通过一些特别的方法来进行检测（图 9.4）。

下列观点，即有关寄主基因在植物对病毒侵染的反应效果，来自于许多不同的研究：①显性和隐性孟德尔基因可能都具有影响作用。但是虽然许多影响寄主反应的基因已知是通过孟德尔方式进行遗传，但有时可能也涉及了细胞质间转移方面的因素（Nagaich *et al.*，1968）。②可能是一种基因剂量效应（gene dose effect），也可能不是。③不同位点的基因可能有相同的效应。④寄主的遗传背景可能会影响其抗性基因的活性。⑤抗性基因可能对一种病毒的所有或几种株系具有作用。⑥一些基因可使植物对多种病毒的反应产生影响。⑦植物年龄、环境状态可能与寄主基因型强烈相互作用而产生对病毒的最终反应。⑧侵染途径可能会影响寄主反应。系统性坏死可以通过嫁接方法将一种病毒接种到一种具高抗性的寄主植物上，而这种植物通过机械接种同样的病毒则不出现系统性扩散（如抗 ToMV 的番茄品系；Stobbs and McNeill，1980）。⑨最初认为植物对病毒的抗性，事实上可能是植物对介体的抗性（Dahal，1990a；1990b）。

正如 Fraser（1988，1992）指出的那样，考虑到涉及的寄主植物的复杂性，植物对某一特定病毒有 3 种主要的抗性和免疫类型：①免疫涉及植物种类的每一个体。目前对免疫方面的理论基础几乎还不了解，但它可能与病毒的寄主范围有关，有关病毒寄主范围已在第 3 章第Ⅴ节中进行了讨论。②品种抗性是指这样一种情况，即一种植物种类中的一个或一个以上品种或繁殖的品系（breeding line）显示出抗性，而其他品种或品系

则不具抗性。③当其他易感个体植株被一种病毒接种后，赋予植株的抗性是获得性或诱导性抗性。这种现象已在第 10 章第Ⅲ节 K 中进行过讨论。一些研究者一直认为免疫和品种抗性是建立在截然不同的潜在机制上。但是有研究表明，在只用一种细菌病原基因进行该病原物研究时，结果显示了这类病原物至少有两种现象具有同样的基础（Whalen *et al.*，1988）。

B. 对病毒抗性的遗传学

这部分将简单概述可用于病毒控制的作物抗病毒的遗传学类型。在第 10 章中讨论了这类抗性的可能机制。Ponz 和 Bruening (1986)、Fraser (1987a, 1988; 1992)、Evered 和 Harnett (1987) 、Khetarpal 等 (1998) 、Hammond (1998) 就植物对病毒抗性发表了综述文章。

表 16.4 显示了在大多数作物与病毒的组合中，植物对病毒的抗性是由单个显性基因控制的。但是这可能只反应了一个事实，即许多具抗性的品种是通过引进单个抗性基因育种而形成的。而且，不完全显性可能是基因剂量效应或由于环境因素造成（Fischer and Rufty, 1993）。在野生植物种类抗性遗传方面的研究一直进行得不多。表 16.5 给出了植物抗性方面的显性基因、非完全显性基因和明显隐性遗传基因等几个特殊的例子。

表 16.4 植物抗病毒基因的大致数目

抗病基因	单基因	寡基因或多基因
显性	81	10
隐性	43	20
不完全显性	15	6
性质未知	—	4
抗病基因总数	139	40

承蒙版权所有者(©The American Phytopathological Society)惠允，引自 Khertarpal 等(1998)。

表 16.5 寄主植物抗病毒基因的实例

基因名称	寄主种类	病毒	已知强毒株	文献[a]
显性基因控制的				
N	心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)	烟草花叶病毒(TMV)	无	1
N'	毛叶烟(*N. sylvestris*)	烟草花叶病毒(TMV)	有	2
Zym^b	南瓜(*Cucurbita moschata*)	小西葫芦黄花叶病毒(ZYMV)	无[b]	3
Tm-2	番茄(*Lycopersicon esculentum*)	烟草花叶病毒(TMV)	有	4
$Tm\text{-}2^2$	番茄(*L. esculentum*)	烟草花叶病毒(TMV)	有	5
Nx、*Nb*	马铃薯(*Solanum tuberosum*)	马铃薯 X 病毒(PVX)	有	6
By、*By-2*	菜豆(*Phaseolus vulgaris*)	菜豆黄花叶病毒(BYMV)	有	7
Rsv_1、Rsv_2	大豆(*Glycine max*)	SbMV	有	8
不完全显性基因控制的				
Tm-1	番茄(*L. esculentum*)	烟草花叶病毒(TMV)	有	9
L1、*L*、*L3*	辣椒(*Capsicum* spp.)	烟草花叶病毒(TMV)	有	10

续表

基因名称	寄主种类	病毒	已知强毒株	文献[a]
双基因	大麦(*Hordeum vulgare*)	大麦条纹花叶病毒(BSMV)	有	11
多基因	豇豆(*Vigna sinensis*)	南方豇豆花叶病毒(SCPMV)	?	12
明显隐性基因				
By-3	菜豆(*P. vulgaris*)	菜豆黄花叶病毒(BYMV)	无	13
Sw_2、Sw_3、Sw_4	番茄(*L. esculentum*)	番茄斑萎病毒(TSWV)	有	14

注:a. 文献: 1. Holmes (1929); 2. Melchers 等 (1966); 3. Paris 等 (1988); 4. Pilowski 等 (1981); 5. Cirulli 和 Alexander (1969); 6. Jones (1982); 7. Schroeder 和 Provvidenti (1968); 8. Buzzell 和 Tu (1984); 9. Fraser 等 (1980); 10. Berzal-Herranz 等 (1997); Dardick 和 Culver (1997); Dardick 等 (1999); 11. Sisler 和 Timian (1956); 12. Hobbs 等 (1987); 13. Provvidenti 和 Schroeder (1973); 14. Finlay (1953)。

b. 抗病性由三基因(*zym-1*、*zym-2* 和 *zym-3*)赋予，其中 *zym-1* 为必需的，*zym-2* 和 *zym-3* 减弱了感病程度。经允许，引自 Paris 和 Cohen(2000)。

有时植物对病毒的抗性与对其他种类病害因子的抗性结合起来。因此烟草对 PVY 一个株系的坏死反应，可能是由基因调控的对根结线虫抗性的一种多效性作用（Rufty *et al.*，1983）。

1. 基因对基因假说

在寄主植物与真菌或细菌病原物之间基因对基因的关系（gene-for-gene relationship）已广为所知。这种关系主要是在植物与病原物的基因分析的基础上确立的。对这类寄生物而言，寄主植物赋予相应抗性的每个等位基因，都可能对应着寄生物中克服该抗性的一个互补的毒性基因座（complementary virulence locus）。毒性基因和无毒基因以及植物抗性已在第 10 章中进行了讨论。

病毒和病毒株系应与表 10.1 中所定义的寄主的各种抗性结合起来进行描述。这样，如果某一特定植物种类或品种对某一病毒免疫或具抗性，那么该病毒可以说对该植物种类或品种是非致病性的。如果一种病毒通常引起某一植物种类或品种的系统性病害，则该病毒是致病性的。将对病毒具免疫或抗性的一个基因转入这样一个植物种类或品种可能使病毒变成无毒性。但是一种病毒突变株系可能会克服寄主植物的抗性基因，然后这种突变株系就会对植物具有毒性。

一些研究植物与病毒互作的工作者提出了基因对基因关系（Fraser，1987a）。将基因对基因假说应用于一种植物病毒与它的寄主植物且研究较为透彻的例子是番茄对 ToMV 的抗性（表 10.3）。番茄有 3 个抗性基因：*Tm-1*、*Tm-2* 和 *Tm-22*，病毒进化变异能克服寄主的所有 3 种抗性基因。根据病毒株系克服寄主的抗性基因种类而将其进行编号。例如，株系 0 是无毒性的，株系 2 能克服基因 *Tm-2*，株系 1.2^2 克服基因 1 和 2^2。还未发现能同时克服基因 2 和 2^2，或基因 1、2 和 2.2^2 的病毒株系。寄主基因型不同，它们在田间的“持久性”（durability）也不同。只含有抗性基因 *Tm-1* 的番茄商业品种一年内出现了株系 1 分离物。与此不同的是，含有多抗性基因 *Tm-1*/*Tm-1*：*Tm-2*/*Tm-22* 或 *Tm-1*/＋：*Tm-2*/*Tm-22* 的抗 ToMV 的番茄商业品种对 TMV 具持久的抗性（Fraser，1985）。

表 10.3 总结的关系，与细菌、真菌和它们寄主之间基因对基因关系具有表观相似性。这类病原物含有大量基因，同时能容易保持或形成一套能容忍或克服寄主抗性的基因。相反，ToMV 只含有病毒复制或移动的 4 个基因。病毒毒性的改变必然涉及这 4 个基因中的一个或更多基因的突变，或在病毒基因组的调控元件中发生突变。Meshi 等（1988）的研究提供了这样的一个例子。他们测定了一个能克服植物抗性的 ToMV 株系 Ltal 的核苷酸序列，虽然在番茄植株体内存在基因 *Tm-1*，但该株系仍然能够进行复制（如表 16.6 中基因型 1 的一个株系）。他们发现病毒核酸中两个碱基的替代导致了氨基酸的改变，即在病毒的 130 kDa 蛋白质中的谷氨酰胺 979（Gln979）变成谷氨酸（Glu），在 180 kDa 蛋白质中的组氨酸 984（His984）变成酪氨酸（Tyr）。他们将这些突变单独或一起引入病毒的亲代株系（parent strain），使该病毒亲代株系克服了寄主的抗性，由此证明了这些突变确实是使寄主抗性改变的原因。构建的所有 3 个突变体，可以在具有抗性基因 *Tm-1* 番茄植株原生质体中进行复制，但是其组氨酸 984 向酪氨酸改变的比率明显降低。

另一个克服植物抗性的 ToMV 株系 Ltbl，可以在具有抗性基因 *Tm-2* 的番茄植株内进行增殖。与其 ToMV 亲代病毒不同的是，这个株系的核苷酸序列分析揭示了 30 kDa蛋白质的两处变化（半胱氨酸 66→苯丙氨酸 和谷氨酸 133→赖氨酸）（Meshi *et al.*，1989）。因此，番茄植株内的抗性可能涉及病毒在细胞间移动的几个方面。

表 10.3 中病毒基因型 2 和 2^2 的突变，涉及由 TMV 基因编码的移动蛋白的核苷酸变化，就像在 *ts* 突变体 LsI 已发现的那样（参见第 9 章第Ⅱ节 D.1.a）（Nishiguchi and Motoyoshi，1987）。因此对于病毒来说，病毒的毒性或无毒性由病毒复制或移动所必需的基因上的单个点突变所控制，而不是由决定保持或克服寄主抗性的基因的一些变化所调控。

2. 寄主的免疫和抗性机制

已知的寄主免疫和抗性的一些分子机制的详细情况已在第 10 章中做了介绍。这里将讨论与控制植物病毒有关的一些方面的内容。

a. 豇豆对 CPMV 的抗性

豇豆品种 Arlington 的幼苗和分离的原生质体均对 CPMV 具有抗性。因此该品种就如同表 10.1 所定义的那样，可以称之为免疫。在该品种与感病品种（黑眼）进行杂交时证明了这种免疫性是由单个显性基因控制的。Ponz 等（1988a）在 Arlington 豇豆原生质体提取物中发现了 3 种抑制性物质，其活性高于黑眼的原生质体提取物。这些物质是：①CPMV RNA 的翻译抑制剂；②降解 CPMV 蛋白的蛋白酶；③CPMV 多聚蛋白（polyprotein）蛋白酶解加工（proteolytic processing）的一种抑制剂。这些蛋白酶不是 CPMV 蛋白的专化性酶，且不与植株对 CPMV 的免疫性一同遗传。

多聚蛋白加工的抑制剂对 CPMV 是专化性的，预期它作为一种介导对 CPMV 免疫的因子，具有协同遗传能力。有理由得出这样一个结论，即蛋白酶抑制物质是寄主编码的基因产物，也是寄主植物对 CPMV 免疫的原因。这是首例鉴定的针对植物病毒的基因产物，这也是阐明免疫性的分子机制的第一个例子。翻译抑制物质活性的遗传是复杂的，但它们的一种或多种会在免疫中起辅助作用。在另一研究中，Ponz 等（1988b）发

现 Arlington 豇豆品系也有抗 TRSV 的单个显性基因，但它与导致对 CPMV 具免疫效应的基因是不同的。

b. 减缓病毒系统性移动

在具有某种基因而对某一特定病毒具有抗性的一些作物品种中，病毒在这些植物体内维管束组织中移动时会受到影响，且显示出这种影响方式与下面将要讨论的病毒编码的细胞间移动蛋白无关。例如，PLRV 在具抗性的马铃薯品种的韧皮部扩散过程中受到影响，使得介体桃蚜（*Myzus persicae*）的获毒效率极低（Barker and Harrison，1986）。同样地，对 MDMV 具抗性的玉米接种叶里病毒的扩散方式表明植株可抑制该病毒通过维管束（Lei and Agrios，1986）。这种寄主反应的分子机制尚不清楚。

在放线菌素作用下，TMV 30 kDa 移动蛋白在烟草原生质体中的表达得到强烈而且选择性地提高（Blum *et al.*，1989）。这表明，该药剂可能选择性地抑制了一种寄主的因子，而这种寄主因子本来通常抑制 30 kDa 病毒蛋白的表达。

c. 非专化性病毒抑制物质

许多植物的提取物含有某些物质，当它们与病毒接种物混合时，可抑制病毒的侵染。一些物质可以抑制实验系统中的病毒复制，已知其中很多是蛋白质或糖蛋白。目前还不知道这些物质中的任何一种是否与植物对病毒的抗性相关。研究最多的一种是从美洲陆商（*Phytolacca americana*）中分离到的一种 29 kDa 蛋白质，这种蛋白质已知可抑制一系列真核生物核糖体。Ready 等（1986）的研究结果显示了该陆商蛋白（*Phytolacca* protein）主要位于细胞壁中。他们提出，在病毒侵染过程中，细胞受伤后抑制物质会进入细胞质终止病毒的合成。

d. 无效的病毒基因

第 9 章（第Ⅱ节 D）已讨论过，许多病毒编码的一种基因产物对其在细胞间移动是必需的。如果一种移动蛋白在某一特定寄主植物中是无效的，则该病毒复制就可被局限在最初侵染的细胞中。结果使这种植物显示出高度过敏性（表 10.1）（不一定是一种坏死反应），而对该病毒产生有效的抗性。在某一特定植物种类中通常不能系统移动的一种病毒，当另一种非亲缘病毒在该种植物上系统性侵染、而且又弥补了前一病毒在移动方面的缺陷时，该病毒便可在植物中系统性移动（参见第 9 章第Ⅱ节 D.6）。这揭示了病毒移动蛋白与植物种类之间的不匹配（mismatch）可能是植物抗性的一种十分普通的机制。

3. 抗性基因的聚集

在一些植物中，抗病毒基因聚集在染色体的一个特异位点上；在这方面，病毒抗性类似于真菌抗性（Boller and Meins，1992；Pryor and Ellis，1993）。例如，在豌豆（*Pisum sativum*）中，对 PSbMV、BYMV、WMV-2、CYVV 的扁豆（lentil）株系及 BCMV NL-8 株系的抗性是被染色体 2 上紧密连锁的隐性基因所控制的（Provvidenti，1990；Provvidenti and Alconero；1988）。另一些例子包括甜瓜（*Cucumis melo*）中对 WMV 和 ZYMV 抗性基因的紧密连锁（Anagnostou *et al.*，2000）及黄瓜（*C. sativa*）中对 PRSV-W、ZYMV、WMV、MWMV 抗性的紧密连锁（Grumet *et al.*，2000）。

C. 耐病性

遗传学控制耐受性的经典例子是安白伦玛（Ambalema）烟草品种。TMV 可侵染该种植物并在其内增殖，但是在田间，感病的植株在其外表上几乎很正常。这种耐受性是由于一对相互分隔的隐性基因 r_{m1} 和 $r_{m2'}$ 存在，同时也可能受到其他较次要的因素影响。

已知其他的耐受性是由单个基因或许多基因控制的，如一组大麦基因型对 BYDV 的耐受性是由可能具有不同等位基因的单个主效基因控制，而表现出不同程度的耐受性（Catherall *et al.*，1970）。通过研究感染 CaMV 的植株中相当丰富的 DNA 形式（DNA form）和病毒卫星 RNA，Covey 等（1990）得出这样一个结论，即 CaMV 微型染色体（minichromosome）的表达是寄主调控的病毒复制循环的重要阶段。与芜菁相比，甘蓝（kohlrabi）是一种对该病毒的侵染更具有耐受性的寄主。在该寄主中，DNA 超螺旋高水平积累，而 RNA 转录和病毒基因产物和病毒粒体产生很少。

D. 应用常规抗性控制病毒

Scholten 和 Lange（2000）讨论了一种通过育种来获得对引起甜菜丛根病的一种重要病毒抗性的方法。他们讨论中的许多方面适用于通过该方法来获得对其他病毒的抗性。这部分将讨论采用常规抗性来控制病毒的应用例子。

1. 免疫

通过嫁接接种 RVCV，不能使 7 个树莓品种受到该病毒感染，证明这 7 个品种对 RVCV 具有明显的免疫性（Jennings and Jones，1986）。一些芜菁品种（*Brassica napus*）表现出对 TuMV 的免疫（Tomlinson and Ward，1982），一些大麦品种表现出对 BaYMV 的免疫。用带病毒的禾谷多黏菌（*Polymyxa graminis*）培养物对植株根部接种，植株未受到该病毒侵染。很少或不存在从一种免疫品种根部生长的真菌卵孢子来传播病毒这种方式。

虽然做了许多探索，但仍很少能将对病毒和类病毒的真正免疫性整合到实际生产上有用作物的品种中。例如，Singh 和 Slack（1984）发现属于 81 种薯类茄属植物（*Solanum*）的 555 个引进品种中，没有一个对 PSTVd 具有免疫性。

2. 抗性

当可以将合适的基因导入农业性状好的作物品种时，通过育种来获得对某一病毒的抗性是解决病毒病的最佳途径之一。对于许多具有相当重要性的病毒，科学工作者一直在做这方面的努力。至今已发现了一些抗性或过敏性基因，但常常有证据表明这些因子很难导入到有用作物品种中去。

对病毒的过敏反应包括非系统性扩散的局部坏死，这在第 10 章第Ⅲ节中已做了介绍。这种过敏反应在田间表现了对病毒的有效抗性。例如，心叶烟（*N. glutinosa*）对 TMV 的坏死反应通过育种而进入普通烟（*N. tabacum*）的一些商业化种植品系（Valleau，1946）。从此它被广泛应用于弗吉尼亚型（Virginia-type）烟草品种，但是在

烤烟（flue-cured）类型烟草中没有应用。

即使某地的许多品种对某一病毒高度感病，偶尔也会发现有个别植株对该病毒具高度抗性。但是设计高抗某一特定病毒的一个作物品种或基因型，常常可能是暂时性的，因为可能存在着出现该病毒的突变体而克服植物抗性的现象。

将任何种类的抗性作为控制病毒的措施，其存在的主要问题是它的持久性。在一个克服作物抗性的病毒株系（强毒株）出现前，作物品种的抗性可持续多久呢？Fraser（1992）列出已发现抗性基因的87种病毒寄主组合。在它们中，已证明75%以上已有了可克服抗性基因的毒性病毒分离物（表16.6）。经试验发现，低于10%的抗性基因在长时间内，才可对范围广泛的病毒分离物保持有效的抗性。但是一些毒性分离物只在实验室条件下发现，而在田间则未发现。

表16.6 打破寄主抗病性植物病毒分离物发生概况

	免疫或阈下侵染	局部坏死斑	部分局限化	系统有效	未知
抗病性表现型					
显性等位基因	5	22	1	3	8
不完全显性	0	0	4	11	0
隐性优势	6	0	3	9	4
毒性分离物	是	否	未测		
显性等位基因	20	4	16		
不完全显性	9	3	3		
隐性	9	4	8		
合计	38	11	27		

承蒙版权所有者(©Kluwer Academic Publishers)惠允,引自 Fraser (1992)。

培养抗性作物的繁育计划花费肯定会比在作物产量上的可能收益高（Buddenhagen，1981），其中涉及了许多因素：①与别的产量降低因素相比，病毒病造成的严重程度如何。②可用的抗性基因的“质量”，如抗CMV的抗性基因通常较“弱”且短命，这至少是田间有许多CMV株系存在的部分原因。③作物的重要性。例如，一种不太重要的观赏性植物与一种主要粮食作物如水稻进行比较。④作物品质。强的病毒抗性可以使作物产量增加，但它可能会伴随着产品品质的下降，这种现象在一些抗TMV烟草品种已出现过（Johnson and Main，1983）。

a. 抗性基因型的来源

对于特定的作物和病毒组合，我们经常可发现没有抗性存在。例如，在莴苣70个品种和500个繁殖品系中没有存在对BWYV的抗性（Watts，1975），但后来发现存在着抗性（Maisonneuve *et al.*，1991）。Russell（1960）在100 000株甜菜幼苗中没有发现对BYV的抗性。在这种情况下，也许应该在野生种类中寻找抗性。一般地说，很有必要扩大寻找抗性基因的范围。例如，在英国22种园艺作物中，已知它们对25种能侵染这些作物的病毒不具抗性（Fraser，1988）。虽然如此，人们还是发现了有效的抗性来源且目前已将它们进行应用（Khetarpal *et al.*，1998）。对害虫和病原物基因抗性的主要来源，是作物种类的起源中心和作物品种多样性地区。在这些地方，植物在长时期内

易受到害虫或病原物的选择压力而形成抗性（Leppik，1970）。具有 PLRV 抗源的茄属植物种类可以很好地说明这个问题（表 16.7）。

表 16.7　含有对 PLRV 抗源的茄属植物种类

种类	系列	倍性	起源国家	栽培或野生	结薯
S. etuberosum	Etuberosa	2×	智利	野生	无
S. brevidens	Etuberosa	2×	阿根廷、智利	野生	无
S. raphanifolium	Megistacroloba	2×	秘鲁	野生	有
S. chacoense	Yungasensa	2×	阿根廷、玻利维亚、巴拉圭	野生	有
S. acaule	Acaulia	4×	阿根廷、玻利维亚、秘鲁	野生	有
S. demissum	Demissa	6×	墨西哥	野生	有
S. phureja	Tuberosa	2×	玻利维亚、哥伦比亚、厄瓜多尔、秘鲁、委内瑞拉	栽培	有
S. tuberosum ssp. *andigena*	Tuberosa	4×	阿根廷、玻利维亚、哥伦比亚、厄瓜多尔、秘鲁、委内瑞拉	栽培	有
S. tuberosum ssp. *Tuberosum*	Tuberosa	4×	智利	栽培	有

经允许，引自 Barker 和 Waterhouse（1999）。

有时人们发现一些现存的品系或品种具有一定程度有用的抗性，如菜豆 Corbett refugee 对 BCMV 具有抗性（Zaumeyer and Meiners，1975）。但抗性可能不总是一致的。例如，即使在玉米的自交系，也存在着对 MDMV 抗性的不同（Louie *et al.*，1976）。同一品种甘蓝的不同品系间存在着对 TuMV 不同程度的抗性（Polak，1983）。

偶尔地，通过对染病而受害严重的地块中初选出那些生长良好的植株，就可以确定这些植株是有用的抗源（Cope *et al.*，1978）。对于重要的作物而言，其抗源的寻找是在世界范围内进行的。Timian（1975）对世界大麦种质库（Barley World collection）的 4889 份材料进行试验，发现只有 44 个在田间对 BSMV 侵染没有表现症状。另一个例子是 Kenten 和 Lockwood（1977）在西非国家加纳的 Amazon 北部地区发现了 CSSV 的抗源（Legg and Lockwood，1977），同时他们也尝试将各种来源的抗性结合起来。

可通过物理或化学方法诱导得到一组突变体，有时在这些突变体中可发现有用的抗性。例如，Ukai 和 Yamashita（1984）在这类大麦突变体中确定了一个对 BaYMV 具高度抗性的突变体。

植物细胞如原生质体的培养，原则上有几种可能性来获得对病毒的抗性。但是现有的成功应用于商业化的抗病毒品种中，还没有一个抗性品种是通过这种方法得到的。Shepard（1981）对此做了回顾。当植物细胞培养了一段时间，且从单个细胞或一丛细胞产生再生植株时，可能会观察到有相当多的基因变异或体细胞无性系变异（somaclonal variation）具有不同的特性，其中包括对病害的抗性。科学工作者一直尝试通过组织培养与诱变结合，来提高变异的频率和范围。从叶盘长出的偶发性枝条产生了番茄的体细胞无性系变异体，这些变异体显示了对 ToMV 具有某些抗性。

在离体状态下，即使属于不同属的原生质体间也能发生原生质融合现象。原则上，这种现象提供了将亲缘关系很远的抗病毒基因转入一种作物品种的可能途径。供体细胞

在与染色体片段融合前经常要先接受辐射。在接下的融合中，以相当随机的方式，将染色体和染色体的部分去掉，直到获得一套基本稳定的染色体。我们的目标就是出现一个细胞品系，其中含有来自于作物品种的一套功能染色体，同时具有所需的一个或多个抗性基因的不同的微量遗传物质。

在模式试验中，通过烟草叶肉原生质体和辐射的胡萝卜原生质体培养细胞间的融合，将胡萝卜的氨甲蝶呤（methotrexate）和5-甲基色氨酸（5-methyltryptophan）抗性转入到烟草中（Dudits *et al.*，1987）。一些再生植株具有烟草的形态学，并具有相互分隔的、来自于胡萝卜的两个抗性标记。

Comeau 和 Plourde（1987）介绍了利用属间杂交寻找小麦对 BYDV 的抗性。在可能与栽培小麦或其近缘种（close relative）杂交过的小麦族（tribe triticeae），发现了大约 20 个种具有明显的抗性。

b. 低水平种子传毒

在前面部分讨论了生长着的植株对病毒感染的抗性。对于通过种传而侵染一年生作物的病毒来说，抗种子传毒可能是田间减少病毒感染的一个重要方法。例如，大麦中单个隐性基因状态下对种传病毒 BSMV 的抗性（Carroll *et al.*，1979）。将埃塞俄比亚的一个大麦品种 Modjo 中的 3 个抗性基因转入一个大麦新品种 Mobet 中，使该新品种具有优良的农业性状并对种传病毒 BSMV 的蒙大拿（Montana）分离物具有抗性（Carroll *et al.*，1983）。同时也发现了对莴苣的种传病毒 LMV 和一些豆科植物种传病毒的抗性。

c. 对抗性材料进行彻底的检测

在先前的试验中显示抗性的品种或品系，必须在随后一系列条件下进行测试。需考虑到的重要因素有病毒的株系、气象状况（Thompson and Herbert，1970）和接种物压力（inoculum pressure）（Kenten and Lockwood，1977）。

d. 对多重病原物抗性的需求

当需要考虑到几个病毒的株系而不是一个病毒株系时，则寻找合适繁殖材料的困难是综合的。热带非洲的豇豆受害程度相当严重，因为受到了至少 7 种不同病毒的感染。在这样的情形下，育种计划可利用任何能找到的遗传保护形式。目前已发现了对其中 5 种病毒的抗性、过敏或耐受性来源（Matthews，1991）。但是这些病毒中的一些具有不同的株系或分离物，从而有可能克服植物对其他分离物的抗性（van Boxtel *et al.*，2000）。当然更进一步的问题，就是将这些因素与对真菌、细菌的多重抗性（multiple resistance）结合起来。例如，已将烟草（*Nicotiana repanda*）对 TMV、胞囊线虫、根结线虫和野火病（wildfire）的抗性一起整合到普通烟（*N. tabacum*）中（Gwynn *et al.*，1986）。

e. 抗性持久性和克服抗性株系的出现

对于一些植物和病毒，已证明抗性很持久。在美国，已将菜豆品种 Corbett Refugee 对 BCMV 的抗性，通过育种引入到大多数干菜豆（dry bean）和四季豆品种中，且这种抗性历经 45 年还未被克服（Zaumeyer and Meiners，1975）。有关抗性持久性中最值得关注的例子之一是甜菜对 BCTV 的抗性（Duffus，1987）。这一抗性的最初选择是在 20 世纪 20 年代，该抗性是由多基因控制的，植物受病毒侵染后其体内病毒浓度较

低，且具有一个较长的潜伏期。但一年后会出现一系列更具有攻击性的病毒株系。莴苣对 TuMV 的抗性早在 40 多年前就有报道，科学工作者一直以来用来自许多国家的该病毒株系进行试验，但至今未发现克服该抗性的情况（Duffus，1987；Robbins *et al.*，1994）。

CCMV 的一些株系克服了豇豆中的一个过敏类型对该病毒的抗性（Paguio *et al.*，1988）。英国报道了抗 PVX 马铃薯品种的抗性被该病毒的一些株系所克服，但这还未成为一个严重的实际问题（Jones，1985）。在苏格兰，通过采用对 RBDV 优势株系免疫的品种从而控制了该病毒。但这种情况一直受到出现一种能克服该抗性病毒株系的威胁（Murant *et al.*，1986）。

一旦一个相当数目的具抗性种群暴露在田间，这就会给该病毒的一个新株系的进化、引进甚至克服这种抗性提供一种极好的可能性。

Rast（1967a，b）的论文很好地解释了在抗性育种过程中出现病毒株系的问题。他采用来自野生的秘鲁番茄（*Lycopersicum peruvianum*）的 30 个无性系的 64 种 ToMV 不同分离物，这些不同的分离物（即使来自该病毒的同一株系，也要在番茄或烟草上进行症状鉴别）能侵染不同的番茄无性系，每一个无性系至少可被一种分离物所侵染。

即使形成了一个外表上看上去很成功的抗性品种，也要考虑采取其他方法将该抗性品种与靶病毒间的接触减到最少，这方面的工作可能是很重要的。例如，病毒 ToMV 在几周内不能在抗性番茄植株体内系统移动，其病毒浓度较低（Dawson，1967）。与易感品系相比，抗性番茄植株提取液中的病毒比从易感品系提取的病毒，对健康抗性植株更具侵染性。感染了该病毒的抗性番茄植株表现出更明显的症状。

抗 ToMV 的番茄 $Tm2^2$ 基因已使植株在 10 多年时间内受到有效的保护。但目前在实验室条件下，已发现了能克服 $Tm2^2$ 基因抗性的病毒株系。这些新的病毒株系成为在番茄商业化温室生产的优势株系，可能只是一个时间问题。

在现有的对大多数作物和病毒的认识上，我们可以推断出寻找病毒抗性的新来源和将这些抗性整合到有用作物中去，将是一个不断进行且是一个长期的过程，就像我们在真菌和其他寄生因子方面做的工作一样。Buddenhagen（1983）讨论了寄主遗传因子与病毒其他流行学方面因素的内在关系。

3. 耐病性

如果在寄主植物上没有遗传抗性源，则有时就要寻找具耐受性的品种或小种。但与遗传抗性相比，耐受性远不能令人满意。原因如下：

（1）对于别的寄主而言，具耐病性的染病植物可作为一种侵染源。因此如果在病毒扩散较快的情况下，将耐病性品种与易感品种生长在一起将是非常不利的。

（2）栽培中会混进大量受病毒感染的植株。这会使寄主或病毒的遗传结构改变而产生耐受反应的突破。

（3）耐病性品种的铺开，暂时消除了人们去发现对该病毒具免疫性品种的动机，直到有一天这种耐病性品种以一种“眼不见，心不想”的方式失效。

（4）病毒感染可能会增加植株对一种真菌病害的易感性（参见第 10 章第Ⅴ节 G 部分）。

但是，当病毒感染引起作物严重损失、同时又不能清除病毒而存在这种巨大的病毒源时，与种植普通品种相比，耐病性品种的产量较高。因此在实际生产上耐病性已经被广泛应用（Posnette，1969）。生长在美国中西部的普通小麦和燕麦品种，由于 BYDV 在该地区的流行，这些品种可能以一种偶然的方式而对该病毒的耐病性做了选择（Clement *et al.*，1986）。人们在玉米中发现了对 MSV 的耐受性后，迅速将其整合到高产玉米种群中，使其在热带非洲地区应用（Soto *et al.*，1982）。Walkey 和 Antill（1989）得到了一个不寻常的实验结果，这就是一个称作 Fructidor 的大蒜品种，经过选择的原种其产量明显低于未经过选择的染病原种。

Salomon（1999）认为与培育抗性品种相比，培育耐病性品种更具有优越性，因为它受到的克服抗性株系的选择压较小。对于真菌和细菌病原物可能是如此，但这种观点是否也适用于病毒尚不能确定。

第Ⅵ节　用转基因技术对抗植物病毒

A. 导言

目前已有可能将外源基因导入到一种植物中并使转入的基因得到表达。原则上，这种方法可以使对某一特定病毒具抗性或免疫的基因，在种、属、科范围内转移。而且，有可能将基因进行设计后去直接干扰或诱导寄主去干扰病毒的复制循环。目前正在积极探索培育对病毒侵染具抗性的转基因植物途径。

转入的抗病毒基因主要有 3 个来源：①天然的抗性基因；②来源于病毒序列的基因，它产生被称作“源自病原物的抗性”（pathogen-derived resistance，PDR）；③来源于其他各种干扰靶病毒的基因。这些内容将在后面章节中讨论。这方面的综述文章有许多，如 Beachy（1993）、Fitchen 和 Beachy（1993）、Wilson（1993）、Scholthof 等（1993）、Baulcombe（1994）、Hull（1994）、Wilson 和 Davies（1994）、Lomonossoff（1995）、Baulcombe（1996）、Prins 和 Goldbach（1996）、Beachy（1997）、Palukaitis 和 Zaitlin（1997）、Kaniewski 和 Lawson（1998）、Bendahmane 和 Beachy（1999）、Hammond 等（1999）、Waterhouse 和 Upadhyaya（1999）。本章这一部分的内容是近 7 年来在这方面工作的回顾，从而显示对这一课题理解的飞速发展。

B. 天然抗性基因

植物种类中发现的、赋予植物对各种病毒的抗性基因的分子特征，已在第 10 章中进行过讨论。当一个抗性基因被确定后，它可以被分离并转入另外的植物种类中去。

对 PVX 具极大抗性的 *Rx1* 基因已从马铃薯植株中分离出来，并转化到本生烟（*Nicotiana benthamiana*）和普通烟中，而使这些植物对该病毒产生抗性（Bendahmane *et al.*，1999）。同样地，天然存在于心叶烟（*N. glutinosa*）的 *N* 基因，使植株对 TMV 有过敏反应，番茄植株因该基因的转入而对 TMV 具有抗性（Whitham *et al.*，1996）。

第Ⅶ节　源自病原物的抗性

Hamilton（1980）最先假定这样一个概念，即利用源自病原物的抗性来对付植物病毒是可能的，Sandford 和 Johnson（1985）将其概括成一个一般的概念。他们指出病原物序列转基因表达可能会干扰病原物自身，这种方式被称作"源自寄生物的抗性"（parasite-derived resistance）。从那时起，这种方法已有几种称谓，包括"非常规保护"（non-conventional protection），"转基因抗性"（transgenic resistance）或"设计的病毒抗性"（engineered virus resistance）。但现在被普遍接受的称呼是源自病原物的抗性（PDR）。自从 20 世纪 80 年代以来，这种抗性途径受到了较多的关注，同时又是形成转基因保护作用来对付植物病毒的主要途径。利用 PDR 来对付植物病毒的首个例子是由 Powell-Abel 等提供的（Powell-Abel *et al*. 1986）。他们的研究结果显示了将 TMV 外壳蛋白在烟草植株中的表达，可使这些植株对 TMV 具抗性。这就像打开防洪闸门一样，使得在转基因以抵抗植物病毒及其相应机制这两方面的研究更广泛地开展起来。

在 Sanford 和 Johnson 提出概念的基础上产生的一种基本观点是，如果人们知道了某一病原物对寄主植物起作用的分子间相互作用，那么可以设计出一种机制来干扰它们之间的相互作用。虽然这一概念可应用于所有病原物和无脊椎动物害虫，但主要还是在控制病毒中应用，因为病毒的基因组相对较小。人们在发展这个理论中认识到，这种相互作用在病毒侵染循环中的所有时期都值得关注，从而有可能采取各种方法，例如，通过阻碍这种相互作用或通过引诱（decoying）其中参与相互作用的一个或几个分子进行干扰。因此产生了这样一个观点，即总的策略就是用专门的分子"子弹"去攻击特定的病毒"靶子"。表 16.8 举出了几例"靶标"、攻击机制或"子弹"。但实际中，在实施这种控制病毒途径前，许多时候对参与其间的分子机制缺乏详细的了解掌握，同时通过对这些实验结果的分析，已使人们知道了几种新的机制。或许最重要的是在第 10 章第Ⅳ节中所描述的基因沉默现象，这种现象在第Ⅳ节 B.3 部分有更进一步的讨论。

表 16.8　PDR 中的"靶标"和"子弹"的实例

靶标	子弹
病毒基因产物	阻断物分子
外壳蛋白	病毒基因产物
复制酶	突变的病毒基因产物
细胞间扩散功能	反义核酸 ± 核酶
蛋白酶	正义核酸
	抗体
控制序列	
复制控制序列	诱饵
复制起点	核酸控制序列
引物结合位点	卫星
表达控制序列	蛋白酶位点
亚基因组 RNA 启动子	
翻译引导序列	其他
剪接序列	非寄主抗病性

承蒙版权所有者（©Kluwer Academic Publishers）惠允，引自 Hull（1994b）。

在这个迅速发展的研究课题中，存在着各种术语方面的问题。其中一个主要问题是定义这种现象为抗性或为保护，这一点在第Ⅶ节 B. 7 部分中已讨论过。只要可能笔者将该现象称之为保护，但是在抗性这一称谓广泛使用的情况下（如来自病原物的抗性这一称谓），笔者就将该现象称为抗性。

目前，人们认为 PDR 有两种基本的分子机制。在一些系统中，一个未修饰过或修饰过的病毒基因产物干扰了该病毒的侵染循环——这一点笔者将其定义为蛋白质水平的保护（protein-based protection）。第二种机制没有涉及蛋白质产物表达，称之为核酸水平的保护（nucleic acid-based protection）。

A. 蛋白质水平的保护

前面已提到，PDR 的首次例证涉及 TMV 外壳蛋白的表达（Powell-Able *et al.*, 1986）。从那以后，已经有许多应用以外壳蛋白为介导的保护作用的例子。病毒基因其他产物的表达也对靶病毒产生或大或小的保护作用。

1. 转基因植物表达一种病毒外壳蛋白

使植物产生保护作用而且应用最广泛的是编码病毒外壳蛋白的基因序列（Fitcham and Beachy，1993），来自于至少 35 种病毒的外壳蛋白基因，代表了 15 个病毒类群，科学工作者已将这些基因转入到许多不同的植物种类中（Palukaitis and Zaitlin，1997）。因为外壳蛋白基因是应用于控制病毒的首例基因，同时鉴定和克隆外壳蛋白基因相对容易。由此产生的抗性常被称之为“外壳蛋白介导的抗性”（CP-MR）。

a. 烟草花叶病毒外壳蛋白

Beachy 等（1986）和 Bevan 等（1985）首次报道了将含有 TMV 外壳蛋白基因的 cDNA 整合到烟草植株中后，发现该病毒外壳蛋白在植株体内的表达。紧接着又有几个研究小组报道发现 AMV 外壳蛋白基因的表达（Loesch-Fries *et al.*, 1987）、van Dun 等（1987）和 Hemenway 等（1988）分别报道了 TRV 和 PVX 外壳蛋白基因表达。一些实验室采用 CaMV 35S 起动子和其他如 19S 起动子来使基因得到表达。普遍认为 35S 起动子更有效。

Powell Abel 等（1986）实验结果显示，表达 TMV 外壳蛋白的转基因植株，或在接种后可避免受到感染，或与对照相比可显著推迟形成系统性病害症状的时间。没有表现出系统感病的植株在未接种叶片上没有病毒积累（Nelson *et al.*, 1987）。当接种能引起局部病斑的一种 TMV 株系时，转基因植株的局部病斑数只相当于对照植株上的 10%～20%。转基因珊西烟（Xanthi nc）植株上的局部病斑比对照植株少，这个研究结果使人想到转基因植物可抵抗初侵染，但不能抑制病毒的复制。但是转基因植株上的局部病斑也可发展成与对照植株上的病斑一样大，这个现象说明一旦起动了病毒侵染，那么植株就不能进一步阻止病毒的侵染循环。

在理论上，转基因植物对病毒侵染的抗性，很可能是由于从 cDNA 转录而来的外壳蛋白 mRNA、外壳蛋白本身或是这两种分子共同作用的结果。为了验证这些可能性，Register 等（1988）构建了一系列的 cDNA，这些 cDNA 或能产生不翻译成外壳蛋白的 mRNA 序列，或是产生缺少复制识别位点但能翻译成外壳蛋白的 mRNA。他们的实验

令人信服地表明了是外壳蛋白而不是 mRNA 引起植株对重复感染（superinfection）的抗性。对 TMV 的进一步实验，证明了较早的研究结果，同时显示了类似 3′tRNA 的序列对产生抗性不是必需的（Powell *et al.*，1990）。

Register 等（1988）、Register 和 Beachy（1988）的实验结果显示，来自于表达外壳蛋白转基因植株上的原生质体可特异性地保护其免受 TMV 的侵染。当烟草原生体接受外壳蛋白后，它们可暂时地免受 TMV 的侵染（Register and Beachy，1989）。由此可见，细胞外的外壳蛋白可能没参与外壳蛋白介导的保护作用中，病程相关蛋白（参见第 10 章第Ⅲ节 K.1）也显示出没有参与这种抗性（Carr *et al.*，1989）。

b. TMV 外壳蛋白介导的保护作用具有剂量和序列依赖性

病毒接种量愈大，TMV 外壳蛋白起到的保护作用就愈小（Nejidat and Beachy，1990；Bendahamane *et al.*，1997）。

转基因的外壳蛋白及挑战病毒的外壳蛋白序列同源性与保护作用水平之间存在着正相关关系（Nejidat and Beachy，1990）。例如，ToMV 和 TMGMV 的外壳蛋白与 TMV 外壳蛋白之间的各有 82%和 72%的同源性，而与 RMV 外壳蛋白的同源性只有 45%，所以与 RMV 相比，TMV 外壳蛋白可更好地保护植物免受 ToMV 和 TMGMV 侵染。这似乎表明外壳蛋白结构和相互作用的羧基羧化（carboxyl-carboxylate）位点上的不同（参见第 5 章第Ⅲ节 B.5），影响了对烟草花叶病毒属的不同病毒的抗性（Bendahmane and Beachy，1999），实验结果也表明，这种转外壳蛋白基因产生的保护作用几乎不能对抗其他科或属的病毒（如 AMV、CMV、PVX 或 PVY）（Anderson *et al.*，1989）。

TMV 外壳蛋白转基因的表达不能保护作物抵抗病毒 RNA 接种（Nelson *et al.*，1987）。

c. TMV 外壳蛋白介导的保护作用的机制

对转基因植株和对照植株上单个病斑中的病毒扩散进行细致分析表明，当表达外壳蛋白的植物组织中发生局部侵染时，植株不能限制病毒随后在细胞间的移动（Register *et al.*，1988）。另一方面，将取自一转基因植株的带叶茎段嫁接在一非转基因植株中部时，可抑制 TMV 在该非转基因植株嫁接部位上方的系统性扩散。表达 TMV 30 kDa 移动蛋白的转基因烟草植株不能免受该病毒侵染或抑制病害形成（Deom *et al.*，1987）。

TMV 在 pH 8.0 时，其体外翻译能力得到极大提高（参见第 7 章第Ⅱ节 B.4）。Register 等（1988）、Register 和 Beachy（1988）发现用这种方法对 TMV 进行处理后，就像能提高其翻译能力一样，而克服转基因植物的抗性。这结果无疑支持了早期的一种现象，这是作为转基因抗性植物的一个重要方面。Osbourn 等（1989b）的研究结果显示，含有 GUS 报道基因的类似 TMV 粒子（TMV-like pseudoparticle），在转 TMV 外壳蛋白基因的烟草植株原生质体的表达效率，是在对照植株原生质体中的 1/100，数据表明约 97%的含 GUS 的类似 TMV 粒子未被编码。但是其他实验结果表明，将外壳蛋白介导的抗性都归因于抑制病毒脱壳（virus disassembly）是不够的，因为还必须考虑到脱壳以后的过程或病毒复制方面的因素。

TMV 突变子 DT-IG 不产生外壳蛋白，不能正常地系统性移动。当将该突变子接种到表达外壳蛋白的转基因烟草植株中时，在系统性侵染叶片中发现了杆状病毒粒体（Matthews，1991）。但是从系统性侵染叶子中分离的杆状病毒粒体不能侵染健康的转

基因植株，这支持了这样一种观点，即病毒早期不包裹与抗性无关。

Osbourn 等（1989a）对来自一挑战病毒接种物中的无外壳包裹的病毒 RNA 进行重新包裹（recoating），来分析在转基因植株中表达的外壳蛋白抑制病毒复制的可能性。他们的实验产生了能表达 TMV 外壳蛋白和一个报道基因（CAT）的双转化烟草植株，在报道基因的转录物中含有 TMV 装配序列原点的一个拷贝。这些植株中的细胞提取液在电子显微镜下没有观察到杆状物，同时 CAT 活性也无明显下降。但是转化植株保持了对 TMV 侵染的抗性。因此，将无外壳包裹的挑战病毒 RNA，用内生外壳蛋白对其进行重新包裹这一过程，看上去没可能参与到表达外壳蛋白的转基因植株的抗性中。

Wu 等（1990）将 TMV 在 CP（+）和 CP（—）原生质体中的共翻译解装配（翻译伴随性脱壳）（co-translational disassembly）（参见第 7 章第Ⅱ节 B. 4 部分）进行比较，其研究结果表明，在 CP（—）原生质体中，TMV 在 5～10 min 内复原了多核糖体，进入的病毒在 60 min 内大多不能被检测到。相反地，在 CP（+）原生质中，输入的病毒没有复原多核糖体，同时在 60 min 内大多数病毒均是完整的。这表明，外壳蛋白介导的抗性很有可能是在病毒进入细胞后的一种早期事件（early event），同时它表明外壳蛋白转基因的表达阻止了病毒脱壳（Wu *et al.*，1990）。

目前有几个关于外壳蛋白如何阻止病毒脱壳的假说。第一个假说认为，转外壳蛋白基因植株中具有一种病毒脱壳抑制剂（Register and Nelson，1992；Bendahmane *et al.*，1997），驱动脱壳反应向装配方向发展。这个假说的主要观点是：病毒粒体脱壳和装配之间的平衡，是由相关的细胞区室中游离的外壳蛋白数量控制。因此没有转外壳蛋白基因情况下，病毒脱壳时细胞内没有或很少有游离的外壳蛋白存在，当“局部”游离外壳蛋白数量显著增加时粒子装配开始发生。在转基因植物中，转入基因的表达产生显著数量的游离外壳蛋白，从而使平衡转向粒子装配方向。

第二个假说认为 TMV 在细胞中的脱壳位置被转基因外壳蛋白阻碍。为了证明第二个假说，Clark 等（1995）假定如果转基因外壳蛋白与一个假定的受体位点的结合在自由基表面识别，那么它表面具有的对含 SHMV 序列的挑战病毒的抗性水平，可能与对 SHMV 病毒本身的抗性水平相似。但是表达 TMV 外壳蛋白的植株对嵌合病毒（chimeric virus）的抗性与它们对 TMV 的抗性一样。当受到外壳蛋白被 SHMV 外壳蛋白所替代的 TMV 突变体挑战时，植株表现出与对 SHMV 同样的低水平抗性。这个实验强有力地表明结合位点这一假说站不住脚。

在第 5 章Ⅳ节中讨论了 TMV 外壳蛋白结构和 TMV 粒子装配所涉及的因子。Bendahmane 和 Beachy（1999）发表文章，综述了通过对 TMV 外壳蛋白进行突变来影响病毒粒体装配的一系列实验。虽然这些实验显示了在保护作用上的不同，但它们没有完全解释清这种保护作用的机制。

d. 其他病毒外壳蛋白

外壳蛋白介导的抗性（保护）已在许多其他病毒科和病毒属中得到了证明（Waterhouse and Upadhyaya，1999）。

表达 AMV 外壳蛋白的植株对 AMV 侵染具有抗性（van Dun *et al.*，1987；Loesch-Fries *et al.*，1987；Turner *et al.*，1987），即使这种外壳蛋白是病毒复制所需要的（参见第 8 章第Ⅳ节 G）。转 AMV 一种突变外壳蛋白基因的植株也具有同样的抗性（van

Dun *et al*., 1988b)。

表达 PVX 外壳蛋白的转基因烟草可显著保护植株免受 PVX 侵染，表现出在接种叶片上局部病斑数目明显减少，减缓或无系统性病害症状形成，同时在接种和系统性感染的叶片中病毒积累减少。外壳蛋白表达得越多，植株保护作用水平就越高（Hemenway *et al*., 1988）。表达一种反义外壳蛋白转录物（antisense coat protein transcript）的植物对 PVX 侵染具有抗性，但是只有在接种物病毒浓度较低时才有抗性。由这种转基因植物提供的保护程度与外壳蛋白基因表达程度相关。图 16.14 显示了表达 CMV 外壳蛋白转基因植株所表现出的显著保护作用。当接种物浓度提高时这种保护程度就下降。



图 16.14 表达 CMV CP 基因的烟草对 CMV 机械接种的作用。接种浓度 25 μg/ml；CP⁺ 植株（后排）和 CP⁻ 植株（前排）接种后一个月。经允许，引自 Cuozzo 等（1988）。

和 TMV 一样，AMV 和 TRV 的外壳蛋白也不能保护植株免受 RNA 接种物侵染（van Dun *et al*., 1987；Loesch-Fries *et al*., 1987；Angenent *et al*., 1990），但高水平表达 PVX 外壳蛋白的转基因植株对 PVX 的 RNA 侵染具有抗性（Hemmenway *et al*., 1988），这与 TMV 不一样。

表达的外壳蛋白不一定必须是靶病毒的外壳蛋白，但这两者应是显著相关的。例如，LMV 外壳蛋白在烟草植株的表达导致了该植株在田间对 PVY 的抗性（Dinant *et al*., 1998）。

在一个构建物中可以使两种外壳蛋白得以表达。Marcos 和 Beachy（1997）设计了一个构建物，内含烟草花叶病毒属病毒 TMV、马铃薯 Y 病毒属病毒 SMV 的外壳蛋白以及高度特异性的 TEV NIa 蛋白酶。在转化该构建物的植株中，蛋白酶加工的多功能多肽使两种病毒外壳蛋白积累，从而这些植株可免受 TMV 和 PVY 的侵染。同样地，表达 TSWV 的 N 基因序列和 TuMV 外壳蛋白的本生烟（*Nicotiana benthamiana*）植株可抵抗这两种病毒的侵染（Jan *et al*., 2000a）。表达 CMV、WMV2 和 ZYMV 的外壳蛋白基因的南瓜品系对这 3 种病毒具抗性，Fuchs 等（1998）证明了这些基因可以叠加（pyramided）。

令人感兴趣的是，"外壳"蛋白介导的保护作用，对于具有几种外壳蛋白或没有普通的衣壳的病毒均有抗性。转化水稻病毒属（*Oryzavirus*）RRSV3 种结构蛋白（S5、S8 或 S9）之一的水稻植株显示了对该病毒的抗性（Waterhouse and Upadhyaya, 1999），但是没有观察到这些基因中的任何一个在水稻植株中得到了表达。纤细病毒属病毒（tenuiviruses）是核糖核蛋白（ribonucleoprotein）其粒子主要的蛋白质是核衣壳（N）蛋白（参见第 2 章第Ⅲ节 I）。表达 RSV 的 N 蛋白的转化水稻植株对该病毒具抗性（Haykawa *et al*., 1992）。

2. 病毒移动蛋白

病毒编码的蛋白促使病毒在细胞间移动，这方面内容在第 9 章（第Ⅱ节 D.2）中已

介绍过。移动蛋白的结核与功能之间的关系表明，如果利用一种有缺陷的突变移动蛋白而阻碍其移动功能，则可能会得到一种更广泛的抗性（Cooper *et al.*，1996）。BMV移动蛋白的表达使植株对TMV具有部分抗性（Malyshenko *et al.*，1993），表达马铃薯X病毒三基因块（triple gene block），可使植株对其他具相似基因组构成的病毒具有抗性（Beck *et al.*，1994；Seppänen *et al.*，1997）。但是一种功能性移动蛋白可弥补具缺陷的蛋白，当转基因烟草植株表达30 kDa移动蛋白时，就可能使运输缺陷的TMV LSI突变体移动（Deom *et al.*，1987）。

转入的BDMV移动蛋白基因的表达不利于植株的发育生长（Hou *et al.*，2000）。

3. 病毒复制酶蛋白

含有AMV的RNA 1或RNA 2的cDNA拷贝的烟草转化植株对AMV没有抗性（van Dun *et al.*，1988a）。不知道这个结果是否是由于表达水平低造成的，也不知道在同一植株中的这两个基因是否都赋予同样的抗性。含TRV PLB株系的13 kDa和16 kDa非结构蛋白基因的烟草转化植株，或含TRV TCM株系的29 kDa非结构蛋白基因的烟草转化植株，没有检测出对相应病毒的抗性（Angenent *et al.*，1990）。

表达复制酶蛋白的植株对3种植物病毒AMV（Brederode *et al.*，1995）、CMV（Palukaitis and Zaitlin，1997）和TMV（Golemboski *et al.*，1990）具有抗性。转化AMV的P1或P2复制酶基因，或转化P2基因突变体、因截去N端而与TMV 54 kDa类似的基因，或变成VDD的GDD模体（依赖于RNA的RNA聚合酶的催化部位，参见第8章第Ⅳ节B.1部分）都不能使植株对该病毒具抗性（Brederode *et al.*，1995）。但是，将GDD模体突变到GGD、GVD或DDD，可使植株对AMV具高水平抗性。

正如在下文第Ⅴ节B部分所讲的一样，在大多数情况下复制酶序列可产生RNA介导的保护作用。但是，AMV、CMV和TMV转基因植株中都显示了转入基因mRNA积累具有相对较高的稳定状态。在每一种情况下，构建物中只含有部分复制酶蛋白，也就是TMV 54 kDa复制酶的一半（参见第7章第Ⅴ节E.1）、截短的CMV 2a蛋白和AMV 2a蛋白。经检测，转入截短的编码2a蛋白基因对CMV具抗性（Carr *et al.*，1994），但对其他两种病毒无抗性。转入基因的可翻译性增加了这种保护作用的有效性（Wintermantel and Zaitlin，2000）。编码TMV和AMV蛋白序列的突变对保护作用造成干扰的事实表明，保护作用也涉及了这种蛋白质本身（Carr and Zaitlin，1992；Brederode *et al.*，1995）。PVY Nib基因的表达可能是蛋白质介导的（Audy *et al.*，1994）。

表达TMV 54 kDa蛋白质的转基因植株对TMV U1或该病毒的高浓度RNA的侵染具有抗性。这些转基因植株对一种U1突变体也具抗性，但对其他烟草花叶病毒属病毒或CMV没有抗性。来自转54 kDa蛋白质基因植株的原生质体实验表明，这种表达54 kDa蛋白质所具有的抗性涉及了一个特别早期的事件。Carr等（1992）证明了植株具抗性需要54 kDa蛋白质的表达，但Marano和Baulcombe（1998）指出当这种抗性至少有一部分建立在核酸基础上时，情况会变得更复杂些。

在Patukaitis和Zaitlin（1997）的论文中所讨论的各种观察资料表明，这种形式的保护作用不是显性负突变效应（dominant negative mutant effect），而是表示出复杂而微妙的机制。这表明转入的复制酶蛋白与病毒编码的其他蛋白质之间的相互作用，可能

会使病毒在侵染循环中的错误时间内进行复制和在细胞间移动，从而导致病毒复制过程中几个阶段的延滞。

将 ACMV 复制相关基因（AC1）的一个构建物进行突变，来改变 NTP 假定的结合位点。当该构建物在本生烟（*Nicotiana benthamiana*）中表达时，该植株显示出症状出现延缓和（或）出现轻微症状（Sangare *et al.*，1999）。突变基因的高水平表达是这种保护作用所必需的。

B. 核酸水平的保护作用

1. RNA 介导的抗性

目前人们已认识到可能有 4 种保护作用形式建立在病毒 RNA 序列表达基础上：①由病毒正链 RNA 序列诱导的保护作用；②病毒负链 RNA 诱导的保护作用；③卫星病毒 RNA 诱导的保护作用；④针对病毒基因组核酶的保护作用。

在发展利用外壳蛋白介导的抗性的早期，有一些没有预想到的发现。例如，马铃薯 Y 病毒属病毒 PVY 或黄症病毒属（*Luteovirus*）、PLRV 外壳蛋白在马铃薯植株中的表达与抗性之间无相关性（Lawson *et al.*，1990；Kawchuk *et al.*，1990）。Lindbo 和 Dougherty（1992a，b）发现，与全长或截短了的可翻译外壳蛋白基因构建物相比，TMV 不能翻译的外壳蛋白基因赋予植株以更高水平的抗性。TWSV（De Haan *et al.*，1992）和 PVY（Van der Vlugt *et al.*，1992）的不能翻译序列赋予植株的抗性也有类似的结果。这些现象和其他类似的发现，说明了这种保护作用，至少在这样的情况下，是由核酸介导的，而不是蛋白质介导的。

因为至今还未发现无启动子的转基因能给植物以保护作用（Lomonossoff，1995），故可推断出很可能是 RNA 转录物，或是 RNA 编码的一种蛋白质赋予了这种保护作用。将一个不能产生蛋白质的构建物来转化植株，可以很明显地看出，这种转基因植株产生的任何抗性都要归因于 RNA。但不是所有表达一种非编码 RNA 的植物品系都能产生这样的保护作用。当一个能产生一种病毒蛋白的构建物转化到一种植物中时，就很难分清植株产生的保护作用是由于这种蛋白质本身的表达引起，还是由于 RNA 转录物造成。但是，这种保护作用的许多不同的特点倾向于 RNA 介导的保护作用。

（1）RNA 表达水平与保护水平之间没有直接的相关性（ Pang *et al.*，1993）。

（2）通常不能检测到转入基因编码的蛋白质，在接种植物中常常只有少数转录物具稳定状态。

（3）这种保护范围通常较窄，对所防卫的病毒株系具有与转入基因相似的序列。

（4）与外壳蛋白介导的保护不同，RNA 接种不能克服这种保护作用。

（5）也不像外壳蛋白介导的保护，RNA 介导的保护不是剂量依赖型的，且可在高水平接种物条件下发挥作用。

（6）插入到寄主基因组中的基因含有多拷贝，特别是编码区域的正向重复序列（Sigen *et al.*，1996）。

（7）转基因的拷贝可以是已经截短的，和（或）以反义方向（antisense orientation）插入载体的（Waterhouse *et al.*，1998；Kohli *et al.*，1999）。

(8) 转基因序列，而且有时它们的启动子都可能被甲基化（Jones *et al.*，1999；Kohli *et al.*，1999；Somada *et al.*，1999）。

当仔细检测了转录物水平后，人们认识到抗性表现型的3大类别：

(1) 植物完全敏感。这些植物具有中低水平的转基因转录和稳定状态的RNA。

(2) 植物感染病毒后又恢复。在这些植物受病毒感染时，它们含有中高水平的转基因转录物和稳定状态的RNA，但在已恢复的植物组织中这种稳定状态的RNA处于较低水平。

(3) 高抗植物。这些植物中具有高水平的转基因表达，但低水平稳定状态。

自从认识了蛋白质介导与RNA介导的保护间的区别，至今已有转入病毒序列的许多转基因植物例子，它们都显示了RNA介导的保护特性。

2. 引起RNA介导保护的核酸序列

来自病毒基因组的一系列核酸序列都可产生RNA介导的保护。在许多情况下，这种保护产生于前面已讲过的转病毒基因植物。

转入CPMV移动蛋白基因的豇豆植株可免受CPMV的侵染，这是一种RNA基础上的保护机制（Sijen *et al.*，1995）。同时这种植株对含CPMV移动蛋白基因的PVX的RNA也产生了抗性。这种使植株针对PVX侵染的保护作用是由特异定位于转入的病毒移动蛋白基因的3′端转录区、小到60个核苷酸的序列引起的（Sijen *et al.*，1996）。转化该移动蛋白序列一个正向重复序列，可使抗性品系（出现）频率增加20%～60%。

来自BMV基因组4个单独的构建物，即来自RNA 2的一条人工合成的DI RNA、与RNA 2的3′端相同的一条类似tRNA结构的有义链、一段RNA 3基因间隔区的反义链序列，以及编码病毒外壳蛋白的RNA。这些构建物在水稻中表达，都可保护水稻免于BMV侵染（Huntley and Hall，1996）。

马铃薯Y病毒属病毒的外壳蛋白、NIa和NIb区域的表达，可赋予转基因植物以保护。为了证明这些基因联合后是否会带给植株以更大的保护作用，Maiti等（1999）将表达外壳蛋白的转基因植物品系，与同时表达外壳蛋白、NIa和NIb的植物品系进行比较。结果显示，同时表达3种基因的植株对TVMV的抗性总是比单独表达外壳蛋白的植株弱，而且，与后一种转基因植株相比，前者对TEV几乎没有抗性。

大麦转基因植株表达含有BYDV聚合酶基因的发夹结构（hp）RNA，对BYDV-PAV具有免疫性（参见第10章第Ⅳ节D）。以前只有少数成功的尝试可产生转基因保护作用来应对黄症病毒属病毒（McGrath *et al.*，1997；Koev *et al.*，1998；Wang *et al.*，2001b）。这表明hpRNA结构对于获得高水平保护作用是十分重要的。

3. RNA介导的保护作用的分子基础

与已恢复的植物组织中具低稳定状态的转入基因RNA相关的恢复现象、高度抗性植株中低水平稳定状态RNA，以及转基因植株对具有与转入基因序列同源的病毒的保护范围狭窄等事实，都说明了同源依赖性或转录后基因沉默。这方面内容在第10章Ⅳ部分中已做了详细讨论。

4. 蛋白质和 RNA 介导的保护

单一类型的构建物可以赋予植物以蛋白质和 RNA 两种机制介导的保护。例如，转化 TSWV 的 *N* 基因序列，赋予具有高水平表达蛋白的植物品系对异源番茄斑萎病毒属病毒（heterologous tospoviruses）的抗性，但是赋予那些具有最低稳定状态 RNA 和小蛋白质的植株以最有效的保护来对抗同源病毒（Pang *et al.*，1993）。同样地，当转基因大麦植株表达 BYDV-PAV 外壳蛋白时，一些抗性品系具有可检测水平的外壳蛋白，而其他植物就没有（McGrath *et al.*，1997）。

Goregaoker 等（2000）分析了由 TMV 复制酶序列对植株产生的保护，得出这样一个结论，即 RNA 和蛋白质序列共同参与了挑战病毒侵染速度。

转 PMTV 外壳蛋白基因的本生烟（*Nicotiana benthamiana*），不管测出的转录 RNA 或外壳蛋白量如何，都显示了对该病毒的强大抗性（Barker *et al.*，1998）。转 PMTV 非翻译外壳蛋白基因的该植物品系，显示出无抗性或低水平抗性。Barker 等（1998）提出，由 PMTV 外壳蛋白引起的保护类型是唯一的，因为虽然它需依靠有效的外壳蛋白翻译，但它介导强大的抗性。

表达 PLRV ORF4 的一个突变型移动蛋白基因的马铃薯转化植株，表现了对 PLRV、PVY 和 PVX 的广谱抗性（Tacke *et al.*，1996）。其中一个转基因品系具有很强的保护作用来对抗 PRLV，但易感 PVY 和 PVX。对这两种表现型有关的 RNA 水平进行分析可以知道，针对 PLRV 的抗性是由 RNA 介导的，而针对 PVY 和 PVX 的抗性是由结合于胞间连丝重要位点的移动蛋白突变介导的（Tacke *et al.*，1996）。

Palukaitis 和 Zaitlin（1997）意识到有必要去试验大量独立转化突变型，这不只是为了获得具有最强抗性特征的植物品系，也是为了排除这种抗性不是由某一特定构建物引起的可能性。

5. 表达反义 RNA 的转基因植物

有机体进行基因调节的一个方法是由互补 RNA 引起，它可以和特定基因 RNA 转录物结合而阻止它们的翻译。这样的 RNA 被称作反义或 micRNA（干扰信使 RNA 的互补 RNA，messenger-RNA-interfering complementary RNA）。转入植物基因组中的合适反义序列已显示了阻止特定基因的活性（van der Krol *et al.*，1988；Delauney *et al.*，1988）。目前已开始探讨应用这种策略来控制植物病毒的可能性。

不同实验室用一些植物病毒 RNA 序列互补的寡聚核苷酸进行离体研究。PVX 基因组 RNA 的互补脱氧核苷酸引起在无细胞体系中三羧酸循环-2（Krebs 循环-2）的翻译停滞。据认为这是由于无细胞体系中的内源 RNA 酶活性引起（Miroshnichenko *et al.*，1988）。在 TMV 5′端附近序列的互补反义序列阻止了这种 RNA 在一种兔网织红细胞溶解产物中的离体翻译。这种抑制作用可能是由于对核糖体附着（ribosome attachment）的直接干扰（Crum *et al.*，1988）。Morch 等（1987）发现与 TYMV 基因组 RNA 3′端附近复制位点有关的“正义”核苷酸序列，专门抑制从感病植物中分离到的 TYMV 的离体复制活性。有关研究对病毒抑制的可能性的各种体内试验，其适用性还有待于进一步确定。

在含有 CMV 基因组 3 个区域的反义 RNA 的转基因烟草植株中，只有一种显示了对该病毒的某些抗性（Rezaian *et al.*，1988）。Cuozzo 等（1988）比较了由 CMV 外壳蛋白或该病毒反义转录物引起转基因烟草植株的抗性程度。具有义基因的转基因植株中没有症状形成和病毒累积，或这两者都减少，同时在一系列接种物浓度范围内，这种现象也不受接种物浓度的影响。相反地，表达反义链的植株（antisense plant）只在接种物浓度低的情况下才具有抗性。表达与 TMV 外壳蛋白基因互补的 RNA 序列的转基因烟草植株，对 TMV 的抗性没有表达外壳蛋白的转基因植株那么强（Powell *et al.*，1989）。在一些情况下，表达反义 RNA 给予植物以明显的保护，如对抗 BYMV（Hammond and Kamo，1995）。同样地，转化 TRSV 外壳蛋白的正义和反义构建物，都可赋予植物以保护，这种保护明显是一种 RNA 介导的机制。

反义 RNA 也使植物抗双生病毒（Frischmuth and Stanley，1993）。而靶标则包括 TGMV 和 TYLCV 的复制蛋白的稀有 mRNA（Day *et al.*，1991；Bendahamane and Gronenborn，1997）和 ToMoV 外壳蛋白（Sinisterra *et al.*，1999）。反义 RNA 也赋予植物以保护来抵抗类病毒（Tabler *et al.*，1998）。

这种反义 RNA 保护作用的机制，看上去可能与前面所述的 RNA 介导的保护作用类似。

6. 核酶

在第 4 章第Ⅰ节（C. 3. b 部分）和 第Ⅱ节（B. 4. b 部分）介绍过，核酶为催化性 RNA，可将靶标 RNA 的互补链在特定位点切开。因为核酶必须是病毒链序列的互补链，故它可以被看作是一种反义 RNA 链。将一种核酶整合到 TMV 的反义 RNA 链中，与反义 RNA 链本身所赋予植物的保护作用之间没有明显区别（de Feyter *et al.*，1996），但与普通的反义 RNA 构建物相比，含有一个锤头状核酶（hammerhead ribozyme）、针对 PPV 的构建物，可赋予植物以更强的保护作用（Liu *et al.*，2000）。

7. 保护水平

各种形式的转基因保护产生范围很广的植物反应。这些反应可从延缓几天产生症状到完全免疫。这就有必要对抗性和保护加以定义。许多转基因植物的反应不适合表 10.1 所列出的定义。例如，症状表现延缓数天是否可称作抗性？Hull 和 Davies（1992）讨论了这一点，同时他们提出了下列定义：

对某一病毒的抗性是这种植物的一种特性，它可降低病毒增殖并降低或防止病毒在植物体内的扩散和（或）症状产生。

保护是赋予植物的一种特性，它可干扰病毒的侵染循环（病毒侵染循环包括从感病植株至健康植株的病毒传播，以及在健康植株中的系统性侵染）。

这样，前面介绍的大多数表现型应归类为保护作用。

Hull 和 Davies（1992）也进一步提出应该将田间保护分成几个级别来描述转基因植物的表现（表 16.9）。这可使读者理解转基因带来的保护作用水平。但是采用这样一种系统存在着一些问题。首先，在转基因植物品系的亲缘种（sibling）间的保护水平可能不同。在许多关于保护的研究报告中，实验结果是用植物显示（或不显示）病害症状

的百分比或植物数量来表示的。其次，保护水平可随条件（如温度）的不同而变化（Neijidat and Beachy，1989）。最后，保护水平可能随转化体（transformant）后代的繁殖而改变。

表 16.9　建议的保护水平

级别	结果观察
1	对一定范围的病毒完全免疫
2	对某一病毒的一系列株系完全免疫
3	对某一病毒的少数密切相关株系完全免疫
4	阈下侵染，病毒不能从初侵染的细胞中移动出去
5	系统侵染延迟，附带说明时间段
6	系统侵染症状严重度的降低伴随病毒滴度的降低
7	系统症状减弱而病毒滴度不降低

承蒙版权所有者(©CRC Press LLC)惠允，引自 Hull 和 Davies (1992)。

然而对保护水平进行分级也有一些困难。例如，保护水平可能随着植物发育阶段的不同而异（表 16.10）(Jan *et al.*，2000b)，或可能由于环境因素的变化而发生改变。

表 16.10　转基因 R1 南瓜在不同发育阶段接种 SqMV 的反应

基因型	接种后不同天数显示抗病性植株百分率[a]/%		
	17 DAG	31 DAG	45 DAG
对照	0	0	0
SqMV-22	0	7	7
SqMV-3	0(21)	21	17(8)
SqMV-127	79(7)	93	92

注：a. 每个转基因植株的上部 3 个叶片在移栽后 1、3 或 5 周（萌发后 17、31 或 45 天）(DAG 为萌发后天数) 用 1∶15稀释的病南瓜叶片提取液接种，每个处理接种 12～14 植株；括号内数字表示显示恢复表现型的植株数。经允许，引自 Jan 等(2000)。

8. 天然交互保护与转基因保护间的关系

对抗某一病毒侵染的转基因保护作用机制，特别是外壳蛋白介导的保护已与自然交互保护或弱株系保护进行了比较（参见第Ⅳ节 A 部分）。这两者有下面几种相似性：①上述这两种情况的抗性程度都依赖于接种物浓度，高接种物浓度可降低其抗性；②这两种抗性对与某一病毒亲缘关系近的株系都有效，但对无亲缘关系的病毒则无效；③在一些情况下，当用 RNA 而不是完整病毒作为接种物时，交互保护可被大量地克服（Sherwood and Fulton，1982；Dodds *et al.*，1985）。同样地，当用 RNA 作为接种物时，分别表达几种病毒的外壳蛋白的转基因植株的抗性，可被大量地而不是彻底地克服（参见第Ⅶ节 A. 1 部分）；④在经典的交互保护实验中，在两种相似的病毒 AMV 和 TSV 间没有观察到交互保护。在表达这两种病毒外壳蛋白的转基因植株实验中，植株表现出一种对同源病毒侵染的抗性，但对异源病毒的抗性没有发现（van Dun *et al.*，1988b）。

另一方面，在天然交互保护与外壳蛋白诱导抗性之间显示出一些差异。当某一病毒的近缘株系间的交互保护不完全时，这种植株上产生的局部病斑可能比对照植物上的病斑要小得多（以 PVX 为例，图 17.6）。这表明植株感染的第二种病毒株系的移动和/或复制速度被降低了。从图 17.6 显示的对 PVX 的实验结果可以看出，表达 PVX 外壳蛋白的转基因烟草植株形成的局部病斑少于对照植物（Hemenway *et al.*，1988）。但是感染 TMV 的转基因植株上的局部病斑，虽然数量下降，但病斑与对照植物上的病斑一样大，这表明一旦病毒侵染成功，那么转基因植株无法阻止该病毒的复制和局部移动。

交互保护很可能有几种机制。其中之一可能涉及寄主的防卫系统——转录后基因沉默（post-transcriptional gene silencing），因此这与 RNA 介导的保护相似。

9. 卫星介导的保护

病毒卫星的一般特征以及一些卫星 RNA 能减轻辅助病毒引起症状的能力，已在第 14 章（第Ⅱ节 B 部分）讨论过。已有实验表明，表达两种卫星 RNA 的转基因植株在接种其辅助病毒时，产生的症状相对较轻。Harrison 等（1987）的研究表明，含有 CMV 的一种卫星 RNA 的 DNA 拷贝的转基因烟草植株，一旦接种无卫星的 CMV 分离物卫星即开始复制，同时，CMV 复制降低，病害症状大大减轻。在未转化植株上，CMV 分离物引起植株的花叶和矮缩病。在转基因植株上，没有出现花叶症状且植株的长势与健康植株一样。这种效果可持续 14 周，这是试验中的最长时间。而且，从转基因植株种子长出的植株也得到了同样的结果。当用 TAV 对转基因植株进行接种时，病害症状也同样减轻，但 TAV 基因组的合成没有明显下降。Jacquemond 等（1988）的研究结果显示，转化 CMV 的一种卫星 RNA 的烟草植株，对田间传播的主要途径——蚜虫传播的 CMV 侵染具有耐受性。

此外，也有别的卫星与病毒组合的报道，即 TRSV 卫星和 TRSV（Gerlach *et al.*，1987b），他们的研究结果与 Harrison 等（1987）的类似。对表达 TRSV 卫星的全长基因组或 RNA 转录物的互补序列的烟草植株，用 TRSV 接种后，TRSV 卫星 RNA 的合成增加，但是病毒复制降低，同时病害症状也大大减轻。这种保护可一直维持植株的一生。

当用 GRV 和引起严重症状的卫星 RNA 来接种转入 GRV 卫星的一种弱毒变种全长序列的本生烟（*N. benthamiana*）植株时，发现了这种植物具有两种独特的抗性机制（Taliansky *et al.*，1998）。在其中一组转基因植物品系中，有高水平的转录 RNA，同时那种引起严重症状的卫星 RNA 和 GRV 基因组 RNA 的复制都受到了抑制。在第二组转基因植物中，有低水平的转基因 RNA，同时引起严重症状的卫星 RNA 的复制受到了抑制，但 GRV 基因组 RNA 复制没有受到抑制。这可以得出下面的结论，即在第一组植物中，GRV 和引起严重症状的卫星 RNA 复制由弱毒卫星 RNA 进行负调节；在第二组植物中，出现了引起严重症状的卫星 RNA 同源依赖性基因沉默。只用弱毒卫星 RNA 1/3 处的 5′端的序列也可产生抗性植物。

卫星 RNA 应用于转基因植株来对付病毒的侵染，具有优点也有缺点。它产生的保护不受接种物浓度的影响，这点与转化病毒外壳蛋白基因的植株不同。植株的轻度矮化（slight stunting）会给转基因植株带来损失，但这只影响那些在田间受到自然感染的植

物，而如果用一种弱毒 CMV 卫星组合有目的地使植物受到病毒感染，那么所有这样的植株都会遭受损失（参见第Ⅳ节 2 部分）。而且，与用卫星接种的植株相比，转基因植株的抗性可能比较强，不需要在每一季都进行接种，同时突变频率较低。

不管怎么样，用卫星控制病毒的策略有其独特的风险性和局限性。卫星 RNA 可引起其他作物种类感染致病性强的病害，或突变成一种促进而不是减轻病害的类型（参见第 14 章第Ⅱ节 B. 5. a 部分）。另一种风险是接种植物可作为介体传毒的病毒源库。最后，在对抗那些未知的卫星 RNA 的病毒时，应用卫星控制途径会受到限制。

10. DI 核酸介导的保护

干扰缺损（DI）核酸在第 8 章第Ⅸ节 C 部分已介绍过。它们是病毒基因组的突变型，不能自主复制，但其含有的序列可使它们在辅助病毒存在下得到复制。在许多情况下，辅助病毒负责对它们进行扩增，同时它们可减轻由辅助病毒引起的症状。将这 DI RNA 在本生烟（*N. benthamiana*）植株中表达，可使该转基因植物在由 CymRSV 引起的顶端坏死和死亡时得到保护（Kollár *et al.*，1993）。表达 TBSV DI RNA 的本生烟转化植物，在受到该病毒和与该病毒亲缘关系近的番茄丛矮病毒属病毒（CNV 和 CIRV）侵染时得到保护，但是这种转基因植物对一种亲缘关系较远的类似番茄丛矮病毒属病毒（如 CymRSV）和无亲缘关系的病毒（BDMV、PVX 和 TMV）很敏感（Rubio *et al.*，1999）。

表达 ACMV 的 DI DNA 的本生烟转基因植株，可干扰双生病毒属两个基因组元件的复制（Frischmuth and Stanley，1991；1993）。来自转基因植株的持续传播（serial transmission），使得无症状植株数量增加，而这些植物中病毒 DNA 水平低，未检测到。由 DI DNA 提供的保护作用局限于对抗与该病毒的近缘株系。同样地，表达 BCTV 洛根株系（Logan strain）DI DNA 的本生烟植株中，这种病毒株系的积累下降（Stenger，1994）；但是这种植物对 BCTV 其他株系在其体内的积累无效。

C. 其他形式的转基因保护

用源于非病毒本身的各种转入基因，已显示了对抗各种病毒的保护形式。本节中将介绍其中的几种。

1. 表达 PR 蛋白的转基因植株

可引起局部坏死斑的病毒侵染可诱导寄主产生 PR 蛋白，该内容已在第 10 章（第Ⅲ节 K. 1）中进行了介绍。这些蛋白质是非专化性寄主防卫反应的一部分，它们与寄主的局部获得抗性（local acquired resistance）有关。用水杨酸处理叶片诱导产生一些 PR 蛋白，可抑制这些叶片中 AMV 的复制。Hooft van Huijsduijnen 等（1986b）分离并克隆了部分这些蛋白质的 mRNA。转基因植株在合适启动子控制下，PR 蛋白基因可得到组成型表达。原则上，这样的转基因植株可能具有保护作用来抵御一些病毒的侵染。

2. 针对β-1,3-葡聚糖酶的反义 RNA

β-1,3-葡聚糖酶是蛋白质，人们认为它们是组成性表达的成分，并诱导植物针对真菌侵染的防卫系统。人们没有想到的是由于一种反义 RNA 的表达而使植物中缺乏这些酶，从而使普通烟 Havana 425 对 TMV、毛叶烟（*N. sylvestris*）对 TNV 侵染而产生的局部病斑在大小、数量上显著减少（Beffa *et al.*，1996）。这些突变的毛叶烟受 TMV 侵染后，病状减轻，同时发病延缓。

3. 表达特异性病毒抗体的转基因植物

动物具有免疫体系，在面对一种病毒侵染时会产生特异性的抗性蛋白。但在植物中没有这样的免疫系统，同时人们认为植物不可能产生这样的蛋白质。但是 Hiatt 等（1989）的研究表明植物有可能产生这类蛋白质。他们将来自老鼠杂交瘤 mRNA 的 cDNA转化到烟草叶切段（leaf segment）中，然后产生再生植株。表达单条重链或轻链的植物杂交后产生的后代，可同时表达两条链。一种功能性抗体可占叶片蛋白 1%以上。Smith（1996）、Zhang 和 Wu（1998）介绍了植物抗体（plantibody）的产生。

源于抗 AMCV 外壳蛋白的一组多克隆抗性的一种单链 Fv 抗体在植株中的表达，可降低该病毒感染率，同时延缓症状形成（Taviadoraki *et al.*，1993）。

Martin（1998）进一步指出，应在重要的结合位点上表达抗独特型抗体（anti-idiotypic antibody）。抗独特型抗体通过针对一种抗体上与抗原相互作用的部分（antigen-interacting portion）而产生，因此它们具有与抗原相同的表面构象。这样的一种抗体应该和位于外壳蛋白、移动蛋白或复制酶中的一个病毒特异性结构域（virus-specific domain）结合。

植物抗体的转基因表达具有控制植物病毒的潜在用途，同时也具有确定植物蛋白功能的能力（图 16.15）（De Jaeger *et al.*，2000），这包括病害诊断方面涉及的植物蛋白。

4. 表达 2′,5′-寡腺苷酸合成酶的转基因植株

在哺乳动物系统中，干扰素是有效的抗病毒分子。当这种病毒抑制途径中的组分之一，2′,5′-寡腺苷酸合成酶在马铃薯植株中得到表达时，这种转基因植株可免受 PVX 的侵染（Truve *et al.*，1993）。在转基因植株中的该病毒浓度比表达 PVX 外壳蛋白的转基因植株低。

5. 表达核糖体失活蛋白的转基因植株（Wang and Turner，2000）

核糖体失活蛋白（ribosome-inactivating protein，RIP）使 28S rRNA 上的一个特定碱基脱去糖基，同时阻止延长因子 EF-2 的结合。已从几种植物种类上分离出 RIP。表达美洲商陆（*Phytolacca americana*）RIP（如商陆抗病毒蛋白，pokeweed antiviral protein，PAP）的转基因植株，可保护植物来抵抗 PVX、PVY 和 PLRV（Lodge *et al.*，1993）。低水平表达一种 PAP C 端缺失突变体的植株，对 PVX 具有抗性（Tumer *et al.*，1997）。因为完整的 C 端是毒性和烟草核糖体在体内脱嘌呤所需要的，故 PAP 的抗病毒活性可以与其毒性分离开。另一种商陆蛋白 PAP Ⅱ比 PAP 的毒性低，表达该蛋

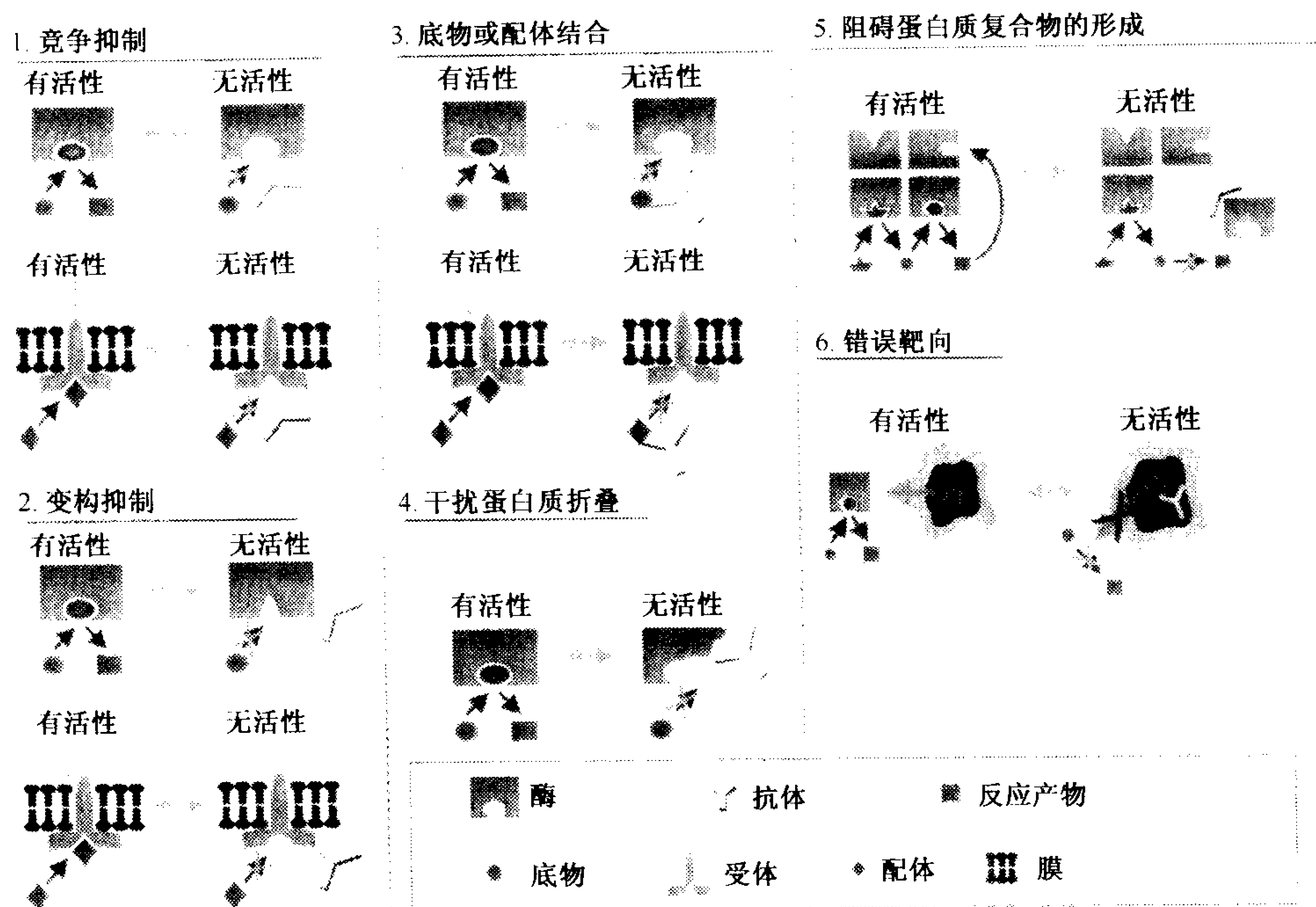


图 16.15 抗体介导的体内蛋白质或信号分子活性调节的可能机制。承蒙版权所有者（©Kluwer Academic Publishers）惠允，引自 De Jaeger 等（2000）。

白的植株可在受到 TMV 和 PVX 侵染时得到保护（Wang *et al.*，1998）；一种类似的蛋白质，来自于另一种商陆（*P. insularis*）的 PIP2，显示了对 TMV 的抗病毒活性（Song *et al.*，2000）。Tumer 等（1999）对商陆抗病毒蛋白及其应用做过介绍。

其他显示抗病毒活性的 RIP，包括来自叶子花（*Bougainvillea spectabilis*）的 BAP（Balasaraswathi *et al.*，1998），可保护转基因植株免受 TSMV 的侵染，天花粉蛋白（trichosanthin）（Lam *et al.*，1996）可保护植株对抗 TuMV。香石竹毒蛋白（dianthin）可赋予转基因植株对抗 ACMV（Hong *et al.*，1996）的能力。

6. 表达核糖核酸酶基因 *pac-1* 的转基因植株

RNA 病毒通过一条互补链进行复制，人们认为在其生命循环中具有一个双链 RNA 阶段。为了攻击这些复制中间体，源自酵母的双链特异性的 RNA 酶基因 *pac-1* 被转入烟草植株中（Watanabe *et al.*，1995）。在接种 TMV 时，转化植株表现出病斑减少，同时用 CMV 或 PVY 对其接种时，这些植株的症状表现延缓。

7. 人类的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C

马铃薯 Y 病毒属病毒用一种多聚蛋白策略来使其基因信息得到表达，然后由病毒专化性蛋白酶将该多聚蛋白切割成有生物活性的蛋白质。这方面的内容已在第 7 章（第 V 节 B.1 部分）做了介绍。HC-Pro 是这种病毒酶中的一员，这是一种类似木瓜蛋白酶的（papain-like）半胱氨酸蛋白酶（cysteine protease）。人类的半胱氨酸蛋白酶抑制剂

(cystatin) C，可干扰由 HC-Pro 催化的 PPV 多聚蛋白的自主加工，同时对一种丝氨酸蛋白酶 NIa 也具有意想不到的抑制效果（Garcia *et al.*，1993）。人们认为这样一种蛋白酶抑制剂在转基因植株内的表达，有可能会阻止病毒在其生命循环中的多聚蛋白加工，从而使植物得到保护。

8. 表达昆虫毒素的转基因植株

苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*）产生一种对昆虫有毒的多肽。这种细菌的不同株系产生针对不同昆虫类群的特异毒性多肽。Vaeck 等（1987）研制了表达这种毒素基因的转化植株，它们可抵抗昆虫的入侵。在病毒的昆虫介体中，只有鞘翅目（Coleoptera）昆虫受到这种细菌的一些菌株产生的毒素的影响。培育转基因植株来抵抗一些植物病毒的甲虫介体在原则上是可能的。

D. 转基因植物的田间释放

人们对于基因改良植物的应用和释放（release）一直有所顾虑。转基因植物与通过常规繁殖技术培育的植物不同，要服从于专门的管理体系。

具有这方面管理体系的大多数国家，在田间释放转基因植物时需经历两个阶段。在第一个阶段，需要在国家生物安全管理机构条例指导下，才能进行转基因植物的释放。这个阶段主要有两个目的：①处理在风险评估中可能确定的任何潜在问题；②评价所试验的转基因植物品系的田间性状。如果转基因植物品系能同时满足管理者和释放者的要求，才能进入第二阶段，即进入更广泛的释放，也称商业释放或种植者释放。本部分讨论转基因植物的田间性状，在下一部分（E）将讨论抗病毒转基因植物可能存在的风险。

转基因植物与那些通过传统育种方法得到的植物品系在田间性状鉴定方面基本没有区别（Delanney *et al.*，1989）。鉴定指标包括评价植株外观、类型、生长势、产量和质量。特别重要的是需评价在这样的条件下，这种具有保护作用的转基因植物的稳定性和持久性。影响稳定性和持久性的因素主要有两个：①气候方面的因素可能影响基因表达；②在病毒生态系统中存在着克服这种转基因保护的病毒株系或分离物，而在最初的温室试验中没有认识到。

人们将一直对转基因抗病毒植物和一些转基因作物品系如马铃薯进行众多的田间控制试验，而番木瓜已进入了更广泛的释放阶段（Perlak *et al.*，1995；Thomas *et al.*，1995；1997；Gonsalves，1998）。这里举几个有关的例子。

田间试验表明，表达 TMV 外壳蛋白的转基因番茄植株可能会得到商业化推广应用（图 16.16）。这些转基因植株对 TMV 与 ToMV 的 L、2 和 2^2 株系具有部分抗性。在田间，只有不到 5%的转基因番茄植株显示了系统性病害症状，而对照有 99%的植株表现系统病害症状。可见症状（visual symptom）的缺乏与 ToMV 的消失相关。接种后的对照植株，果实产量下降了 26%～35%。与未接种的非转基因植株相比，目前没有证据表明转基因植物外壳蛋白的表达会抑制该植物的生长或降低果实产量（Nelson *et al.*，1988）。

在澳大利亚，大多数含有 PLRV 外壳蛋白基因的马铃薯品种 Kennebec 和 Paciffic

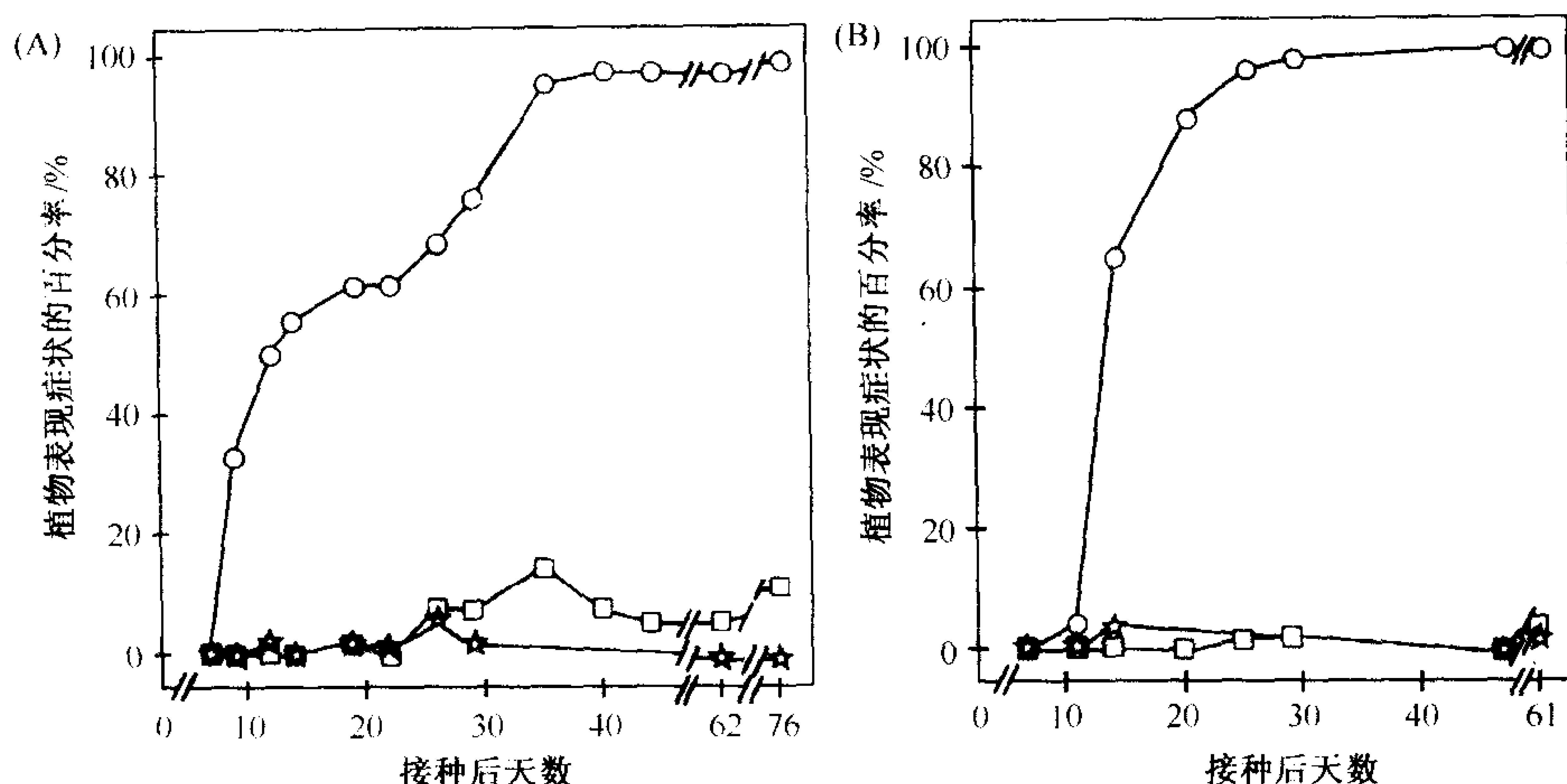


图 16.16 在田间 TMV 侵染的未转 CP 基因的番茄上系统症状的发展。○，非转基因植株；□和☆，表示 TMV CP 的两个转基因番茄品系，移栽到田间 8 天后，用 TMV U1 株系（10 μg/ml）接种顶端的 3 个小叶，每个品系观察 48 个植株。经允许，引自 Nelson 等（1988）。

的一些品系与未感染 PLRV 的非转基因品系相比，两者在农艺性状上没有明显差别（Graham *et al.*，1995）。但是在 PLRV 流行条件下，一种转基因的 Kennebec 品系与非转基因的对照植株相比，块茎产量增加了大约 30%（Barker and Waterhouse，1999）。在美国，含有 PLRV 外壳蛋白基因的 Russet Burbank 马铃薯品系，表现出的对植株的低水平保护防止了 PLRV 的早期扩散，但在病毒扩散的第二阶段，这种保护作用明显下降（Thomas *et al.*，1997）。表达 CMV 外壳蛋白的番茄株系对靶标病毒表现出了田间抗性，但抗性水平低于在生长箱中做的实验（Tomassolit *et al.*，1999）。

在番茄植株中表达 CMV 的弱毒卫星 RNA，可使这种转基因植株在田间对 CMV 具有耐受性（Stommel *et al.*，1998）。Yie 等（1995）描述了表达弱毒卫星 RNA 而抗 CMV 的纯合番茄品系的快速培育。在田间条件下，这些植物中有 3 个品系具有高水平的保护而免受 CMV 的侵染。

具有免受机械接种靶标病毒危害的保护能力的转基因植物，在遇到天然介体传毒时，可能就不具备这种保护作用。例如，表达 PVY 外壳蛋白的一个马铃薯转基因品系，在机械接种时得到可喜的结果，但用蚜虫传毒时，就不表现保护作用（Lawson *et al.*，1990）。同样地，表达 TRV 外壳蛋白的转基因植株也不能保护其免受线虫传毒（Ploeg *et al.*，1993a）。对通过转基因产生的保护作用的稳定性需要特别加以关注。有数种途径可克服或打破这种保护作用，它们包括：

（1）影响转基因稳定性的因素有许多，包括在减数分裂和甲基化过程中的重排。这些通常会在转基因品系的早期世代中显现，而在田间释放的稍后世代中不太可能发生。

（2）在第Ⅶ节 B.7 部分已讲过，环境因素也可能会影响转基因的表达。

（3）在面对各种不同的病毒株系时，这种对植物的保护作用不总是有效的。例如，表达 TRV 的 PLB 或 TCM 株系外壳蛋白的转基因烟草植株，只对那些具有该植株正在表达的外壳蛋白的病毒株系有抗性（Angenent *et al.*，1990）。另一方面，Nejidat 和

Beachy（1990）发现，表达 TMV 外壳蛋白的转基因烟草植株，对 ToMV 和 TMGMV 具有抗性，但对 RMV 没有抗性。表达 TMV 外壳蛋白的烟草植株，当其所处温度由 25℃变成 35℃时，这种转基因植物所具有的保护作用就大大降低。但是，当转基因植株处于白天 35℃，黑夜 25℃的条件下，植物依然保持对病毒的抗性（Nejidat and Beachy，1989）。

（4）在第 10 章（第Ⅳ节 F 部分）已介绍过，一些病毒编码的基因产物可抑制 PTGS。人们有一种顾虑，即由一种病毒引起的 PTGS 抑制，可能会克服一种转基因植物对别的病毒的抗性。但是，Wang 等（2001a）报道，转基因植物受到 CYDV 的协同侵染（coinfection）后，并不危及该植物所具有的对 BYDV-PAV 的抗性。

（5）CaMV 35S 启动子广泛应用于各种构建物中以表达抗病毒基因。但是在受到 CaMV 侵染时，油料作物——欧洲油菜中的这种启动子会发生沉默（Covey *et al.*，1997；Al-Kaff *et al.*，1998，2000）。

E. 与抗病毒转基因植物田间释放有关的潜在风险

抗病毒转基因植物品系应用方面的一个主要顾虑，是它们释放时可能产生的对大环境所具有的潜在风险。许多文章都讨论了这方面的问题（Hull，1990a，1990b；de Zoeten，1991；Hull and Davies，1992；Tepfer，1993；Miller *et al.*，1997）。潜在风险在本质上有 3 个方面，即对人类的风险、对环境的风险和商业风险。对人类的风险基本上指的是，人们食用转基因产品所带来的任何潜在有害影响和这些产品是否有任何过敏特性。例如，我们应特别关注那些因长期消费相对高水平表达的 RIP 转基因食品而具有的潜在风险。潜在商业风险包括转基因品系的农艺性状、转基因保护的持久性及转基因向其他作物扩散的任何可能的结果。这些需要考虑的因素不仅局限于抗病毒转基因植物，还应对其他大多数转基因植物进行这方面的考虑。

科学工作者在抗病毒转基因植物研究领域中，特别注重病毒核酸序列的应用。人们要问的根本问题是，在整合到寄主植物基因组的某一病毒或病毒相关序列与重复侵染该寄主的另一种病毒之间，可能发生相互作用的风险是什么？需要考虑 3 种可能性，即异源包装、重组和协生作用。

1. 异源包装

异源包装包括表达 A 病毒外壳蛋白的一种转基因植物，被无亲缘关系的 B 病毒重复侵染时，A 病毒蛋白的表达不能保护植物免受 B 病毒的侵染。存在的风险是 A 病毒的外壳蛋白可能会包装 B 病毒基因组，从而使这种杂种病毒具有其他特性，如不同的传播特性。

2. 重组

这方面的顾虑就是在转入基因与再度侵染的病毒之间产生重组而可能导致一种新的病毒。重组涉及整合到植物中的序列，这方面的内容已在第 8 章（第Ⅸ节 B.5）中介绍过。在离体条件下，将 CMV 的 *2b* 基因由其源自 AMV 的同源物所代替而得到的一个杂种病毒，比其双亲病毒具有更强的毒性（Ding *et al.*，1996）。特别是黄症病毒属病毒

与这种潜在风险有关（Miller *et al.*，1997）。

3. 协生作用

两种不同的病毒序列可加强两种非亲缘关系病毒之间的协生作用，这方面内容已在第10章（第Ⅴ节F部分）介绍过。因此存在着一种可能性，即一种再侵染的病毒对植物的影响作用，可能会被一种因表达引起协生作用的转基因序列所加剧。

4. 避免风险

对涉及潜在风险方面的分子互作的认识，可采用对转入基因进行“净化”（sanitizing）来避免风险。例如，第1章（第Ⅲ节E.7.b）介绍了蚜虫传播马铃薯Y病毒属病毒时，涉及病毒外壳蛋白的一种氨基酸三联体（amino acid triplet），即由天冬氨酸、丙氨酸和甘氨酸（asp、ala、gly，DAG）组成的DAG模体。在转入的PPV外壳蛋白基因上进行这一部分的突变，可消除蚜虫的传毒能力，但不影响这种转基因对植物带来的保护作用（Jacquet *et al.*，1998）。同样地，PPV外壳蛋白基因上的这种突变，抑制了该病毒在转基因本生烟（*N. benthamiana*）植株中的粒体包装、异源包装和互补（complementation），但是仍可使植株具有保护作用来对抗ChiVMV和PVY的侵染（Varrelmann and Maiss，2000）。对参与重组因素的了解（参见第8章第Ⅸ节B），有助于通过设计转基因构建物，来减少在转基因与一种再侵染病毒之间形成新分子的可能性。同样地，也可避免加剧协生作用的病毒序列。例如，马铃薯Y病毒属的HC-Pro或黄瓜花叶病毒属病毒的2b基因（参见第10章第Ⅴ节F部分）。

在这些风险评估中，分析比较转基因的与非转基因植物的处境是十分重要的。前面所述的发生在病毒间复合侵染时的潜在风险是有可能的，Hammond等（1999）曾讨论过这方面的内容。

第Ⅷ节　讨论与结论

在第3章中已提到，精确估计由于病毒侵染带来的损失是不可能的。对某个特定病毒来说，它所带来的损失因季节、作物、国家和地区不同而异。但无论如何，已有充足的证据表明，我们需要持续不断地努力来避免使这种损失变得日益严重。一旦一株植物感染了某一种病毒，若要治愈原则上是不可行的。热处理和茎尖培养（参见第Ⅱ节C.2.b和C.2.c）只是特别应用于经济价值高的作物。有3种情形特别重要：①一年生主要的粮食作物如谷物、甜菜，它们或者是大规模种植，或者是人类赖以生存的作物，在一些季节条件下，易受病毒病流行的影响。②多年性作物，主要是在时间和土地方面投入大的果树。如果有柑橘衰退病或李痘病等病毒病的扩散，果树会遭受特别严重的损失。③高经济价值作物如烟草、番茄、葫芦科作物、辣椒及一些观赏性植物等，都易遭受广泛扩散的病毒的侵染。

控制病毒的措施可分为3类：①根除或避免侵染源；②控制或避免介体；③保护植物以避免系统性病害的发生。原则上，至今最佳的控制病毒的方法是培育对某种病毒具有永久抗性的作物品种。以往的经验告诉我们，在田间，病毒经常不断地在其毒性和其

能侵染的品种或作物范围方面进行突变。因此对特定病毒和作物而言，抗病育种或培育转基因植株通常不可能是一劳永逸的解决方法。就针对病虫害的常规抗性而言，我们不应对某一病毒种群施加太强的选择压，否则会产生一种克服抗性的病毒株系。但是，Hull（1994）认为，对于在某一病毒复制中产生的变异，如果人们能够有效地抑制病毒复制，那么出现克服抗性的突变的概率就小。而且，如果转基因保护作用是针对病毒复制所必需的高度保守序列或模体，那么很可能任何变株都能够补偿这种缺损。

对于感染病毒的几乎所有作物来说，综合、持续的病毒控制计划是将作物损失降到能接受水平所必需的。这种病毒控制计划通常需要包括刚才所说的所有 3 类控制措施。如上所述，利用抗性或有保护作用的品种或品系是最有希望控制病毒的措施之一。遗传技术在目前和将来都会为病毒控制发挥作用。应用分子标记技术加快了培育抗性品种的速度，许多植物基因组组构共线性（colinearity），有助于预测潜在抗性基因的位点。转基因技术可提供一系列保护基因（protecting gene），一些这样的抗性基因应该是相对持久的。这样，今后培育抗病毒植物应该将常规和转基因途径与抗性基因的堆积（stacking）、叠加（pyramiding）和（或）利用（deployment）等结合起来。在形成病毒综合控制措施中，关键是对这种病害的流行学、生态学，其病原物的遗传组成、功能和突变的潜力有一个完全的了解。

但是科学除了在促进农业生产发展外，其转基因技术的应用已引起了许多公众所关注的问题，如转基因技术在农业生产实际应用时对环境和粮食生产的影响，以及克服生物物种间的屏障所带来的伦理学方面的问题。因此应用转基因技术在增加世界粮食安全的同时，也将涉及关于这种科学与其应用方面的许多问题。

第Ⅸ节　病毒在基因技术方面应用的可能性

A. 作为基因载体

早在 20 世纪 80 年代，人们对应用植物病毒作为异源基因载体导入植物的可能性怀着极大的兴趣。刚开始，这种兴趣集中于植物病毒中唯一具有双链 DNA 基因组的病毒——花椰菜花叶病毒上，因为这种病毒的克隆 DNA 具有侵染的活性（Howell *et al.*，1980）。后来人们将注意力转移到单链 DNA 的双生病毒上，但当 RNA 病毒可以通过反转录形成单链 DNA，进而可产生有侵染活性的 RNA 转录物时，科学工作者们就开始关注 RNA 病毒。

人们认为一种植物病毒作为一种基因载体的重要潜在优势是：①能将病毒或具侵染活性的核酸直接应用于叶片，这样可避免采用原生质体而造成的植物再生困难；②它可重复产生大量拷贝；③在植物染色体 DNA 上没有位置效应；④病毒可在植株内系统移动，这样它具有一种潜在作用，即将外源基因导入像果树一样的多年生植物中。

这种病毒载体，能够以一种不影响该病毒基因组核酸复制或移动的方式来携带非病毒基因。在理论上它有下列特性：①在田间无法在植物间进行扩散，这提供了一种天然的防范系统；②诱导产生较轻的病害或不出现病害；③寄主范围广，这样可以将一种病毒载体应用于许多种植物，但在安全方面可能存在着一种潜在性缺陷；④这种载体在寄

主植物体一生中都保持持续不断的侵染。

植物病毒作为一种载体的主要限制因素是：①它们不随寄主植物 DNA 而被遗传下去，因此由病毒载体导入的基因不能应用于常规育种计划中；②除非种子传毒率很高，否则在每一季都必须对一年生作物进行接种；③用病毒载体通过重组或其他方法将外源基因导入，可能会由于病毒失去外源基因而很快变成野生型；④可能有必要在作物品种上使用一种病毒来引起很轻的症状，即采取交互保护方式。但这种病毒可能会发生突变继而引起严重病害，或者传播至其他感病作物上。在田间，与前一种病毒不具亲缘关系的第二种病毒引起的再次侵染可能会导致严重病害。

1. 花椰菜花叶病毒属病毒

Howell 等（1981）把具有 8 个碱基对的 *EcoR* Ⅰ 接头分子（linker molecule）插到 CaMV DNA 克隆的大基因间隔区（有关 CaMV 基因组参见第 6 章第Ⅳ节 A.1），结果表明这种 DNA 的侵染性没有减弱。Gronenborn 等（1981）报道用 CaMV 作为载体在芜菁植株中完成了外源基因的复制。但他们发现，可被成功复制的插入 DNA 序列大小，应限制在 250 bp 左右。

Brisson 等（1984）首次报道用 CaMV 作为载体将一个外源基因导入植物而在其体内成功表达。源自 *E. coli*，大小为 234 bp 的二氢叶酸还原酶（dihydrofolate reductase）基因，可在细菌中产生氨甲蝶呤抗性（methotrexate resistance）。他们将该基因插入到删除基因Ⅱ的大部分后得到的 CaMV 中，这种嵌合 DNA 在芜菁植株中可稳定地复制，同时来自细菌的基因也能得到表达，这种表达可以通过氨甲蝶呤抗性分析而显示出来。De Zoeten 等（1989）用人类干扰素基因（IFNαD）替代 CaMV DNA 的 ORF Ⅱ。他们得到了在芜菁（*Brassica rapa*）中进行复制、产生 IFNαD 的一个稳定的 CaMV 株系。干扰素局限在 CaMV 的病毒质（viroplasm）中，在一种动物细胞的分析中表明它具有抗病毒活性。

Paszkowski 等（1986）构建了一个杂合 CaMV 基因组，在这种杂合基因组中，原来由Ⅵ基因编码的区域，被选择性标记基因新霉素磷酸转移酶Ⅱ（neomycin phosphotransferase type Ⅱ）所代替。这种构建物在植物中不能生存，且不能通过野生型 CaMV 进行反式互补。但在摄入 DNA 的条件下接种芸薹（*Brassica campestris*）原生质体，可产生携带该标记基因的稳定的遗传转化细胞系。这种情况只有在该杂合基因组 CaMV 与野生型 CaMV 共同接种时才发生。这种效应的机制还不清楚。Pfeiffer 和 Hohn（1989）将 CaMV 作为探针研究了基因在植株中的表达。

因此，这显示了 CaMV 作为一种基因载体有其应用方面的一些限制，包括 CaMV 的粒体包装能力、在不影响该基因组功能的前提下可去除的病毒 DNA 的量，以及该病毒基因组的表达与复制部分之间的相互作用。去除该病毒基因组的非必需区可插入约 1000 bp 的外源基因内（Fütterer *et al.*，1990），但不能确定所有这些去除的序列是否真的非必需。Hirochika 和 Hayashi（1991）提出了利用一对具有重叠缺失（overlapping deletion）的载体的建议。

2. 双生病毒科病毒

现在人们将很多注意力集中到双生病毒上，将它们作为一种潜在的基因载体，因为它们具有 DNA 基因组，同时它们的基因组较小且可以方便地对其进行体外操作（Mullineaux *et al.*，1992；Stanley，1993；Timmermans *et al.*，1994；Palmer and Rybicki，1997）。尽管基因组小可能会限制 DNA 切除的碱基对数量（Davies *et al.*，1987b），但是，要对一些双生病毒加以机械接种，或使其在植物体内系统移动，不一定需要一种有活性的外壳蛋白和包衣壳作用。这抵消了其基因组小的缺陷。

还有其他一些潜在困难（Davies *et al.*，1987b）。可发生重组而出现亲本型病毒分子（parental-type molecule）。多数双生病毒主要被限制在韧皮部及其相关细胞中。但是双生病毒的寄主范围广（与花椰菜花叶病毒相比），因而引起了科学工作者相当的兴趣。其中一些病毒成员可侵染禾谷类作物，如果它们能够经种子传播并且机械接种不是这么困难的话，这些病毒将会非常有用。然而，鉴于其弱点，接种一定规模的禾谷类作物是不实际的。

但是模式实验已表明，用双生病毒可将外源基因导入植物体并使之表达。不同的科研工作者的研究显示，对于 TGMV 复制和移动来说，不一定需要一种完整的外壳蛋白基因。Hayes 等（1988d）构建成了一个杂合 TGMV DNA，其外壳蛋白的大部分基因已被去除，并由细菌的新霉素磷酸转移酶（neomycin phosphotransferase）基因（*neo*）代替。他们用土壤杆菌侵染法（agroinfection）将这种构建物导入烟草植株中。TGMV 的 DNA 在转基因烟草植株中复制，同时 *neo* 基因得到表达。Ward 等（1988）分离了 ACMV DNA 1 的一种外壳蛋白突变体，这种突变体就是将该病毒的外壳蛋白基因上的 727 个核苷酸去除，因而 DNA 不具侵染活性。但是，在外壳蛋白启动子控制的情况下，当这种外壳蛋白 ORF 被细菌的氯霉素乙酰转移酶（chloramphenicol acetyltransferase，CAT）基因编码区域所代替时，DNA 便重新具有侵染性，同时病毒可在植株体内扩散，且 CAT 基因得到表达。比正常外壳蛋白 DNA 大的侵染性构建物（infectious construct），在植物体内系统性移动，可产生强大的选择压，有利于产生正常大小的衍生物（derivative）（Elmer and Rogers，1990）。

瞬间表达系统允许对用来研究细胞中启动子序列活性、RNA 加工信号等的 DNA 构建物进行快速筛选。同时瞬间表达系统可对转基因植物进行先期筛选。原则上，为了得到大量拷贝和迅速表达修饰的基因或外源基因，可能需要改变病毒 DNA 以产生质粒型载体。Elmer 等（1988a）对一种双生病毒进行了研究，在构建这样一种植物质粒方面取得了一些进展。对 TGMV DNA A 进行缺失实验发现，约 1640 bp 或 60%的 DNA A 序列的最小 DNA 片段有能力进行自我复制。

Hanley-Bowdoin 等（1988）的研究结果显示，在对碧冬茄叶盘用农杆菌接种 TGMV的 DNA A 时，在接种后 2 天这种病毒外壳蛋白的基因得到瞬间表达。在外壳蛋白启动子的控制下，用细菌的 CAT 或 β-葡糖醛酸酶（GUS）基因替代这种外壳蛋白 ORF 后形成的构建物，经土壤杆菌侵染（agroinfection）后，这些外源基因也在碧冬茄叶盘中得到瞬间表达。

Gröning 等（1987）发现侵染苘麻（*Abutilon sellovianum*）的一种双生病毒，其

DNA 局限于细胞叶绿体中，这增加了构建一个叶绿体特异性转化载体的可能性。

前面已提到，一些双生病毒如玉米线条病毒属病毒具有在单子叶植物中进行基因表达的潜力。虽然可以用一个 CAT 基因或 GUS 基因来代替 MSV 中的 V2 基因，并将该构建物插到短基因间隔区使插入的基因得到表达，但这种构建物不能系统性移动（Lazarowitz *et al.*，1989；Shen and Hohn，1994）。目前已经得到一种 3.7 kb 大小、基于 WDV 的植物细胞——*E. coli* 穿梭载体（Ugaki *et al.*，1991）。虽然这种穿梭载体已应用于研究玉米细胞中的病毒复制（Timmermans *et al.*，1992），但它是否可应用于所有植物，目前还未可知。

3. RNA 病毒

通过一种 cDNA 的克隆中间体来扩增 RNA 病毒的能力，为将 RNA 和 DNA 病毒作为基因载体提供了可能性。一般在 RNA 复制过程中出现错误的概率很高（参见第 17 章第Ⅳ节 B.4），这可能会限制 RNA 病毒的应用（van Vloten-Doting *et al.*，1985；Siegel，1985）。目前的实验证据表明，至少在短期内，突变可能不是一个重要的限制因素。科学工作者已将球状和棒状植物病毒粒体作为潜在载体进行研究，发现棒状病毒粒体具有更多的潜能，因为它们在可被插入的核酸数量方面较少有限制。

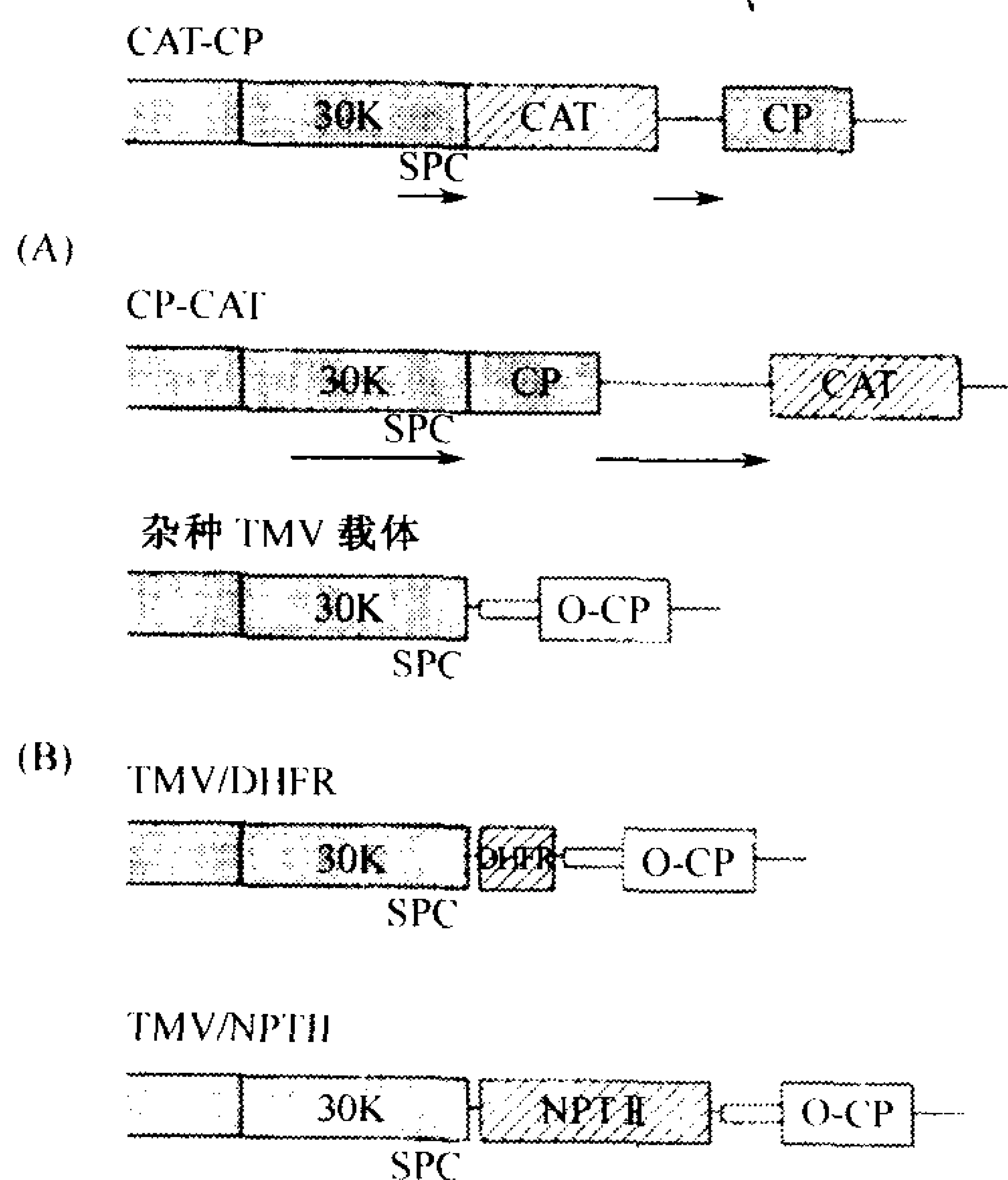


图 16.17 TMV 表达载体的示意图。(A) TMV 突变体编码 CAT 的基因插入 TMV-U1 基因组：为了产生附加的 sgRNA，*cat* 基因融合到 CP 亚基因组启动子的后面，获得的序列重叠被箭头标记于每个构建物的下面。(B) 杂合 TMV 表达载体，其所有 ORF 是 TMV-U1 序列，只有 CP 基因源于 ORSV [由 ORSV 转录出 mRNA，亚基因组启动子（显示为小白框）]。编码 DHFR 和 NPTII 的外源基因经由异源 TMV-U1 亚基因组 mRNA 定位于 30 kDa ORF 的启动子；SPC，TMV-U1 CP 亚基因组启动子。经允许，引自 Porta 和 Lomonossoff（1998）。

a. 烟草花叶病毒（TMV）

Takamatsu 等（1987）设计了一个 TMV 的 cDNA 构建物，其病毒外壳蛋白基因被去掉并用 CAT 代替。当将这个构建物的离体转录物接种到烟草叶片上时，产生的局部病斑比正常侵染的小，但产生了 CAT 生物活性，同时接种后 2 周这种活性增加。从这些叶片中提取 RNA，在体外将其包裹在 TMV 蛋白内，并再次将其接种到烟草叶片上，可以再次检测到 CAT 活性。该结果表明，在植物体内这种 RNA 复制具有某种程度的稳定性。Yamaya 等（1988a）采用一种去除有害基因的 Ti 质粒载体，在 CaMV 的 35S 启动子控制下，将 TMV 基因组 cDNA 拷贝导入烟草植株的基因组 DNA 中。这个实验证明了一种非种传 RNA 病毒也可通过种子传毒。

Dawson 等（1989）构建了一个杂种 TMV，其外壳蛋白和 30 kDa 基因中间插入了 CAT 基因［图 16.17（A）］。这个构建可高效复制，产生一种额外的亚基因组

RNA 和 CAT 活性，同时包装成 350 nm 的杆状病毒粒体。但是在系统侵染过程中，这种插入的基因被准确地删除而产生野生型病毒。人们认为种现象的出现，可能是由于外壳蛋白基因的亚基因组启动子的两个拷贝之间的同源重组造成。Takamatsu 等（1990b）通过 cDNA 构建了一种 TMV 的 RNA，这种 RNA 中具有一个编码亮氨酸-脑腓肽（Leu-enkephalin）的附加序列，这是一种有催眠活性的五肽。他们将这个附加序列整合到编码外壳蛋白序列紧靠终止密码子的上游处。实验结果表明，这种五肽作为一种与外壳蛋白的融合产物在植物原生质体中得到了表达。

为了解决同源序列重组时造成插入基因缺失的问题，Donson 等（1991）研制了一种杂合载体，这种载体含有源自烟草花叶病毒属两种病毒的序列［TMV-U1 和 ORSV，图 16.17（B)］。在这种载体中，所关注的那个基因从 TMV 外壳蛋白亚基因组的启动子开始表达，而外壳蛋白则从 ORSV 的启动子开始表达。这存在着其中一个插入基因 NPT Ⅱ被部分删除的问题，但这属于特异性插入（ insert-specific）。这种载体系统已应用于 α-天花粉蛋白的表达（Kumagai *et al.*，1993），同时这种可表达 ToMV 外壳蛋白而不表达 ORSV 外壳蛋白的载体的衍生物已应用于操作植物中的一种生物合成途径（Kumagai *et al.*，1995）。

b. 马铃薯 X 病毒（PVX）

Chapman 等（1992）设计了与图 16.17（A）TMV 相似的 PVX 构建物，这种构建物中具有两个 PVX 外壳蛋白启动子。构建物中的 GUS 基因于其中一个启动子处开始表达，使不同烟草种类产生系统性感染，特别对克利夫兰烟（*N. clevelandii*）植株来说，这种插入的基因可滞留在其上。

c. 雀麦花叶病毒（BMV）

French 等（1986）构建了不同的 BMV RNA 3 突变体，其中有的病毒外壳蛋白基因被细菌 CAT 基因所替代，有的 CAT 基因插入到外壳蛋白基因近 5′端。当这些 RNA 3 变种与正常的 BMV 的 RNA 1、RNA 2 一起接种到大麦原生质体时，可以在植物体内复制，并产生相当于正常外壳蛋白亚基因组 RNA 一样的亚基因组 RNA（参见第 7 章第Ⅴ节 E. 3. a）。当 CAT 基因插入到具有上游起始密码子的外壳蛋白可读框内时，可在以 Ti 质粒作为载体的马铃薯转化植株细胞中过度表达。

Pacha 等（1990）的实验结果显示，一个从其 5′端到 3′端为 454 bp 的复制子，可包含复制 2.1 kb CCMV RNA 3 所需的所有顺式元件。因此用这样的复制子有可能表达一个相当大小的外源基因。

d. 烟草脆裂病毒（TRV）

Angenent 等（1989c）发现，烟草脆裂病毒（PLB 株系）RNA 2 具有 5′端的340 nt 以及 3′端的 405 nt 的序列时，对于复制就足够了。将质粒 DNA 的一个 1401 nt 序列来替代将被删除的病毒核酸序列，然后将该构建物与正常的烟草脆裂病毒株系 PLB 一起接种到植株上时，该构建物可在原生体中复制，这显示了这种病毒有可能作为一种基因载体。

e. 番茄丛矮病毒（TBSV）

番茄丛矮病毒（TBSV）外壳蛋白对于一些种类烟草的系统性侵染并不是必需的（Scholthof *et al.*，1993），因此它可用外源序列如 GUS 基因取代（Scholthof *et al.*，

1993；Scholthof，1999）。Sholthof（1999）将一个TBSV基因组的cDNA拷贝插入到CaMV的35S启动子和丁型肝炎病毒核酶（ribozyme）的cDNA之间，然后加上胭脂氨酸（碱）合酶（nopaline synthase，NOS）基因的加A（多腺苷酸化）信号，最后将该构建物直接摩擦接种植株而使其具有侵染性。35S启动子和NOS终止子控制该构建物的转录，同时位于这个具侵染力基因组3′端的核酶对该转录物进行切割。这种载体可以使插入进外壳蛋白基因的插入片段得以表达。

B. 病毒可提供转基因植物所用的控制元件

在第7章（第Ⅲ节D. 2. d部分）已解释过，用于转基因植物的构建物中含有各种不同的控制元件。已发现一些植物病毒的核酸序列在嵌合基因构建物中，作为DNA和RNA转录的启动子、mRNA翻译的增强子其活性非常有用。

1. 启动子

a. 花椰菜花叶病毒（CaMV）启动子

CaMV DNA的转录产生一种19S mRNA和一种35S mRNA（参见第7章第Ⅳ节D）。Shewmaker等（1985）将CaMV DNA一个全长拷贝导入到农杆菌Ti质粒的转化DNA（T-DNA）中，然后将其整合到各种各样的植物基因组中。他们的结果显示，19S和35S启动子以这样的形式可在一些植物中发挥功能。它们都是组成型强启动子，在表达一系列异源基因时具有广泛的应用（Balázs *et al.*，1985；Bevan *et al.*，1985；Nagy *et al.*，1986；Odell *et al.*，1985，Lloyd *et al.*，1986）。

已发现在一些系统中，35S启动子比19S启动子更有效。例如，在35S启动子控制下，β-大豆伴球蛋白（β-conglycinin）的α亚基在碧冬茄植株中的表达水平比19S启动子控制下高10～50倍（Lawton *et al.*，1987）。同时也发现35S启动子比来自根癌农杆菌的NOS启动子的效率高10～30倍（García *et al.*，1987a；Saunders *et al.*，1987）。

Kay等（1987）构建了一个35S启动子的变种，它包含了其上游序列的250 bp串联重复。这种修饰使启动子的转录活性提高约10倍。来自玄参花叶病毒（FMV）的“34S”启动子具有与CaMV 35S启动子同样的活性（Sanger *et al.*，1990）。

35S启动子通常是一个组成型启动子。但Benfey和Chua（1989）的研究表明，在这种启动子的控制下，GUS活性在碧冬茄植株中的表达具有明显的组织学定位。与之相反，在19S启动子控制下，CAT基因在烟草植株一系列组织中都可进行表达（Morris *et al.*，1988）。

b. 其他DNA病毒启动子

来自其他DNA病毒如杆状DNA病毒属病毒（badnaviruses）和双生病毒的启动子特性，已在第7章（第Ⅳ节D、E与第Ⅴ节F）中进行过讨论。这样的一些启动子已在转化构建物中显示了活性，但还没有像CaMV 35S启动子那样广泛应用。

2. 作为翻译增强子的非翻译前导序列

已有实验表明，在体内、体外系统和真核、原核系统中，一些病毒的非翻译前导序列是mRNA翻译十分有效的增强子（参见第7章第Ⅴ节C.5部分）。已知苜蓿花叶病

毒（AMV）的 RNA 4 是 AMV 外壳蛋白大量翻译的 RNA。Jobling 和 Gehrke（1987）将一种大麦和一种人类基因的天然前导序列用 AMV RNA4 前导序列置换。这些构建物在兔网织红细胞（rabbit reticulocyte）和麦胚（wheat-germ）系统中，其 mRNA 翻译效率增加了 35 倍。Sleat 等（1987）设计了相同的构建物，包括两种脊椎动物基因的无帽子 mRNA 和细菌 GUS 基因，这个细菌基因含有或缺少源自 TMV RNA 非翻译区（Ω sequence）5′端的 67 个核苷酸序列。在兔网织红细胞、麦胚和 *E. coli* 系统中对这些构建物进行体外试验。在每一个实验系统中，TMV 前导序列几乎使每种 mRNA 的翻译效率得到增强。Gallie 等（1987a，b）的研究扩展了这些实验结果，他们的研究表明这 67 个核苷酸序列，在植物体内的叶肉原生质体和非洲爪蟾（*Xenopus*）体内的卵母细胞中，也可作为一种潜在有用的增强子。Ω 序列的缺失衍生物，在一些细菌系统中表现出的功能相当于一种细菌 mRNA 的核糖体结合序列（Shine-Dalgarno，SD 序列）（Gallie and Kado，1989）。由 TMV Ω 序列带来的翻译增强作用是由应用于体外系统的核糖体组分介导的（Gallie *et al.*，1988b）。Sleat 等（1988c）的实验支持这样的观点，即病毒的非翻译前导序列简化了 RNA 的二级结构，更易于核糖体亚基对其 5′端进行扫描或与起始因子的相互作用。

3. 体外转录研究

体外转录系统可忠实地再现基因在体内的表达，已经证明这套系统在动物或其他系统中对了解参与控制转录的核苷酸序列和蛋白质因子十分有用。Cooke 和 Penon（1990）扩展了该方面的研究而将其应用于植物系统。他们从烟草细胞悬浮液中得到了部分纯化的提取液，含有来自 19S 启动子转录所需的全部蛋白质因子。

4. 用 TMV 装配起点来导入外源 RNA

Sleat 等（1986）的研究结果显示，一个装配起点（OAS）序列位于一个外源 RNA 序列的 3′部分，可在体外起始外源 RNA 的有效包装（encapsulation）。Gallie 等（1987c）对这方面实验做了进一步研究，他们制备了编码 OAS 与 CAT 酶的 RNA 序列转录物，在体外将其包裹在 TMV 外壳蛋白内并接种到一系列类型的细胞中，发现 CAT mRNA 可以瞬间表达。通过免疫金标记定位了脱壳位点，同时证实了在接种的烟草叶的表皮细胞中基因的瞬间表达（Plaskitt *et al.*，1987）。

Sleat 等（1988c）构建了一个包含 TMV 的 5′前导序列、CAT 序列和 OAS 的质粒衍生物（plasmid derivative）。用农杆菌载体将这个构建物导入烟草植株的 DNA 中。当用 TMV 侵染该转基因植株时，这种核 DNA 的转录物被包装成类似 TMV 的杆状粒体。这些实验说明了在寄主基因组和侵染病毒基因组所编码的功能间的一种有效互补。

5. 有潜在价值的其他 RNA 病毒的序列

已经明确了一些 RNA 病毒亚基因组的启动子（参见第 7 章第Ⅴ节 B. 2 部分）。前面已介绍了它们在 RNA 病毒载体方面的应用，也许可以证明它们对基因扩增也有用，但由于目前还未对 5′端或 3′端的序列进行测验，因此不能确定。源自卫星 RNA 序列的简单而特异性的 RNA 酶类（核酶）的潜在利用价值已在本章第Ⅶ节 B. 6 部分讨论过。

C. 用病毒来呈递（表达）异源肽

需要生产小肽的理由有多个，这包括小肽可作为疫苗的表位（epitope）（抗原决定簇）和具有生物活性的肽。在第 15 章（第Ⅳ节 A.2 部分）已介绍过表位（epitope）是具有特定构象的氨基酸片段。游离肽可作为表位，但是它们如果存在于一种大分子装配体表面，其免疫原性就可增加。显示正确构象的肽序列的一个途径，是将其整合到一种病毒的外壳蛋白序列中，让肽暴露在病毒粒体的表面。然后这种病毒粒体可以作为一种疫苗。用植物病毒作为疫苗有几个优点：①在不发达国家生产动物病毒疫苗可能受到限制，而用这种植物病毒可以大量生产；②这种疫苗也许可以作为正常食品的一部分而采用口服形式；③这种病毒不侵染人和其他动物，因此疫苗是完全无活性的；④这种系统不受其他有致病性动物病原物污染的影响。但是一种潜在的缺点是 RNA 病毒的高突变率会导致插入序列的删除或缺失，在 RNA 病毒未遇到选择压的情况下尤其如此（van Vloten-Doting *et al.*，1985）；但经验表明这个问题可能不像原来担忧得那么严重（Johnson *et al.*，1997）。有一些植物病毒已用于异源肽的呈递（表达）。

1. 豇豆花叶病毒（CPMV）

对 CPMV 的结构已解析到了原子分辨率（参见第 5 章第Ⅵ节 B.6.a 部分）（Lomonossoff and Johnson，1991）。其外壳包括两种蛋白质：L 蛋白有两个 β 桶（β-barrel）功能域，而 S 蛋白有一个 β 折叠桶功能域。对其三维结构的分析表明，位于 β 折叠桶功能域之间的环状结构可能适合用来插入外源序列来进行肽的表达，因为它不参与蛋白亚基间的接触。S 蛋白的 βB-βC 环是高度暴露的（Lomonossoff and Johnson，1995），故大多数外源序列均在此处插入（图 16.18）；一些基因被插入其他环状结构中（Lomonossoff and Hamilton，1999）。

早期对 βB-βC 环位点插入的外源序列的研究为构建有活性的、遗传上稳定的嵌合体提供了指导（Porta *et al.*，1994）。它们包括：①插入的外源序列应该是作为附加物，而不是 CPMV 序列的替代物；②要避免序列重叠导致重组而失去插入序列；③准确的插入位点对嵌合体最大限度的增殖很重要。掌握了这些原则，也就具有了一种将外源 DNA 插到 S 蛋白 βB-βC 环中的标准程序（Spall *et al.*，1997）。

已成功制备带有长达 38 个氨基酸的插入序列的嵌合体，在这种嵌合体中外源 DNA 的存在对该修饰病毒的复制没有明显影响。至今已插入过的表位来源于各种病毒，包括人鼻病毒 14（Human rhinovirus 14）、人免疫缺损病毒 1 号（*Human immunodeficiency virus* 1，HIV-1）和犬细小病毒（Canine parvovirus）（Lomonossoff and Hamilton，1999）。

2. 烟草花叶病毒（TMV）

在 TMV 外壳蛋白上表达外源肽的最初尝试是用 *E. coli* 表达载体，产生一种该病毒外壳蛋白的自主装配嵌合体和脊髓灰质炎病毒的一种表位（Haynes *et al.*，1986）。随着 TMV 侵染性 cDNA 克隆的构建，有可能采用一种在植物中可自我复制的系统。将外

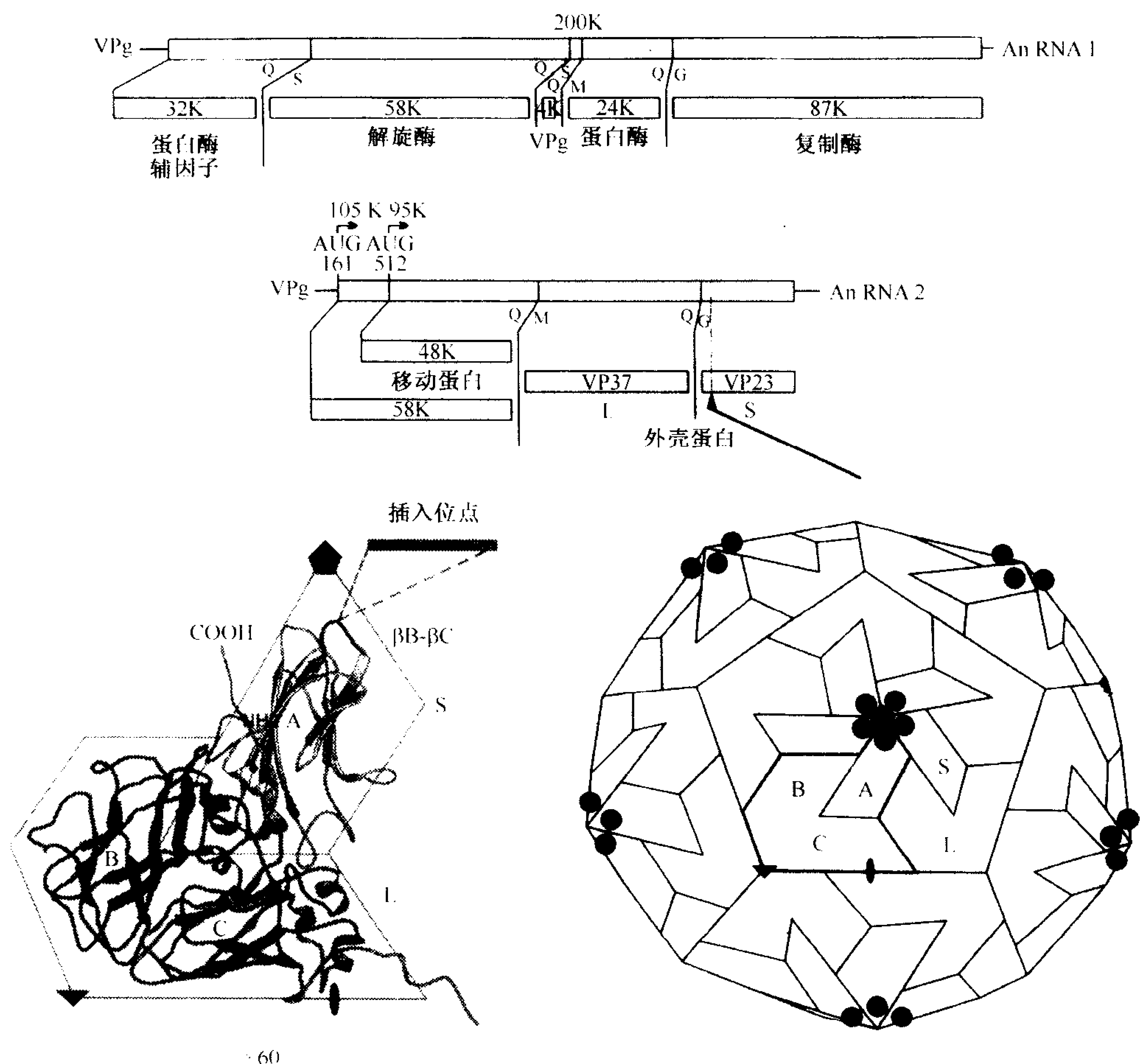


图 16.18 嵌合 CPMV 粒体的形成。外源序列被插入到 RNA 2 上 S 外壳蛋白的基因，RNA 1 和 RNA 2 被翻译为多聚蛋白并经级联切割，显示了其切割位点和产物。RNA 2（具有异源序列）需要与 RNA 1（未改变的）共接种豇豆植株，在其 βB-βC 环隐藏外源抗原决定簇的 S 蛋白和自然的 L 蛋白各 60 个拷贝装配成多面体病毒粒体，外源插入表达在对称 5 联轴（5-fold axes）附近。承蒙版权所有者（©John Willey and Sons Ltd）惠允，引自 Porta 和 Lomonossoff（1998）。

源序列融合到外壳蛋白的羧基端，会阻碍病毒粒体的装配（Takamatsu *et al.*，1990b）。为了克服这个问题，Hamamoto 等（1993）将外源序列插到外壳蛋白基因 3′端的一个琥珀终止密码子后［图 16.19（A）］，这样它就以通读蛋白的形式得以表达。装配成病毒粒体中大约有 5%为带有插入序列的外壳蛋白亚基（Sugiyama *et al.*，1995）。将病毒外壳蛋白靠近 C 端一个表面环上的两个氨基酸替换，可使 100%的病毒粒体含有插入基因的蛋白亚基［图 16.19（B）］（Turpen *et al.*，1995），在 C 端的另一个不参与粒体装配的区域进行类似的替换也可达到同样的效果［图 16.19（C）］（Fitchen *et al.*，1995）。

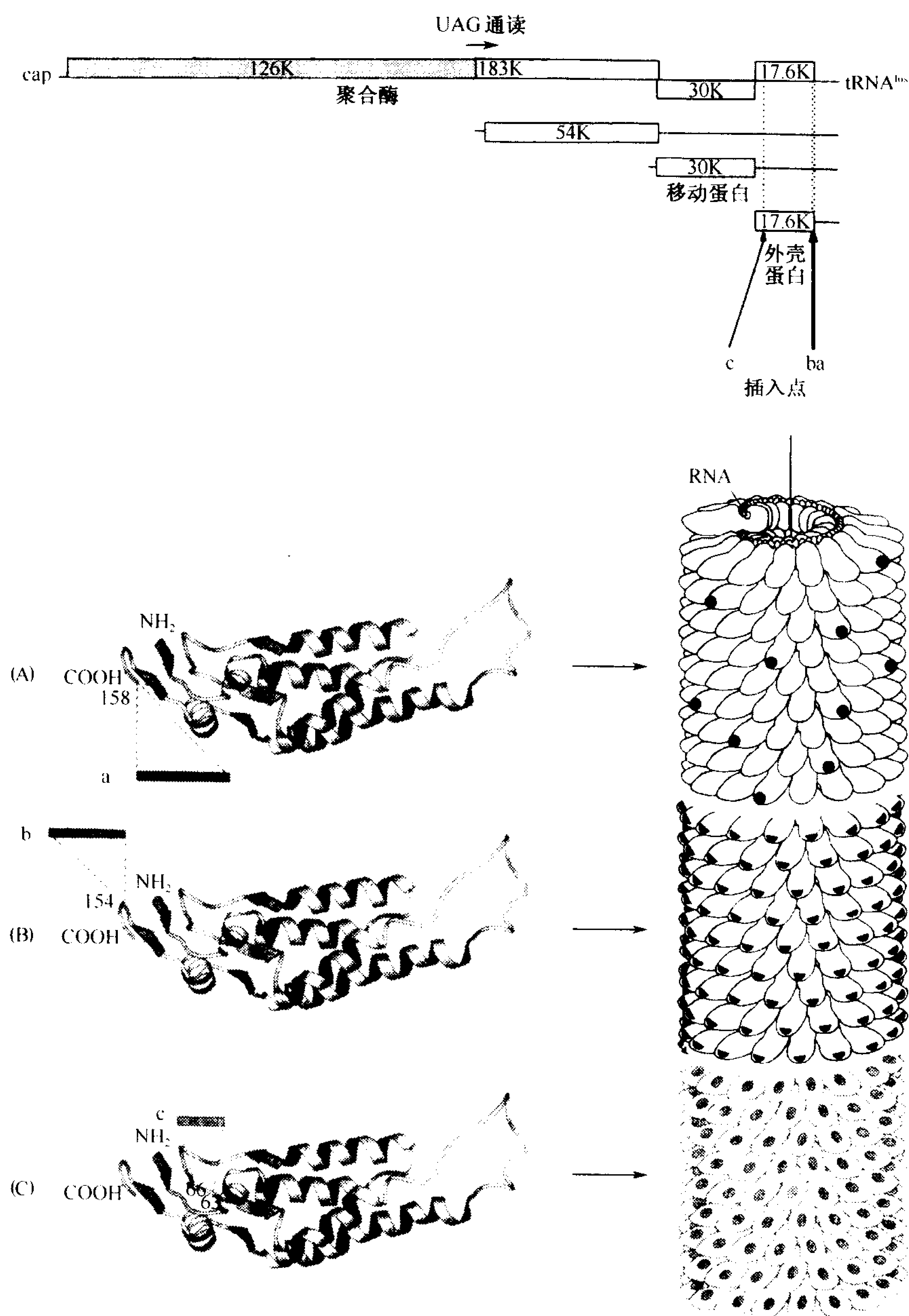


图 16.19 嵌合 TMV 粒体在植物中的形成。外源寡核苷酸序列被插入在 CP 基因标记为 a、b、c 的 3 个位点，其通过亚基因组 mRNA 表达。TMV 改变了的全长基因组 cDNA 的体外转录物被接种到烟草植株上，产生的 CP 重组蛋白作为带状图用数字标记在各插入位点上。在 CP 装配时，嵌合杆状粒体形成，外源肽段被差异显示和分布，a 位点的插入最大 5%，而 b 和 c 位点的插入是 100% 被改变。承蒙版权所有者（John Willey and Sons Ltd）惠允，引自 Porta 和 Lomonossoff（1998）。

3. 其他病毒

马铃薯Y病毒属的约翰逊草花叶病毒（JGMV）外壳蛋白的嵌合体已在大肠杆菌（*E. coli*）中表达（Jagedish *et al.*，1993，1996），提取的蛋白质可以被聚合到类似马铃薯Y病毒属病毒的粒体中。形成的这些病毒粒体可以带有N端的插入序列或C端的一些取代序列。

Santa Cruz等（1996）设计了一个构建物，即PVX外壳蛋白的N端处能产生融合和不融合的绿色荧光蛋白。在该构建物中，通过导入在C端介导加工的口蹄疫病毒的2A序列，将GFP基因和外壳蛋白基因隔离。一些非融合外壳蛋白分子的存在是病毒粒体装配所必需的。在以后的实验中，已经将大小从8.5 kDa到31 kDa的蛋白质在PVX粒体表面作为"外衣"表达（Santa Cruz *et al.*，1996）。

TNSV粒体的装配来自于图16.20显示的构建物，该构建物中病毒外壳蛋白基因的3′端插入外源序列（Joelson *et al.*，1997）。同样地，与TBSV外壳蛋白ORF的5′端部分融合的HIV的p24 ORF在可读框内表达（Zhang *et al.*，2000）。这表明TBSV可容忍其外壳蛋白的N端和C端处插入外源序列。

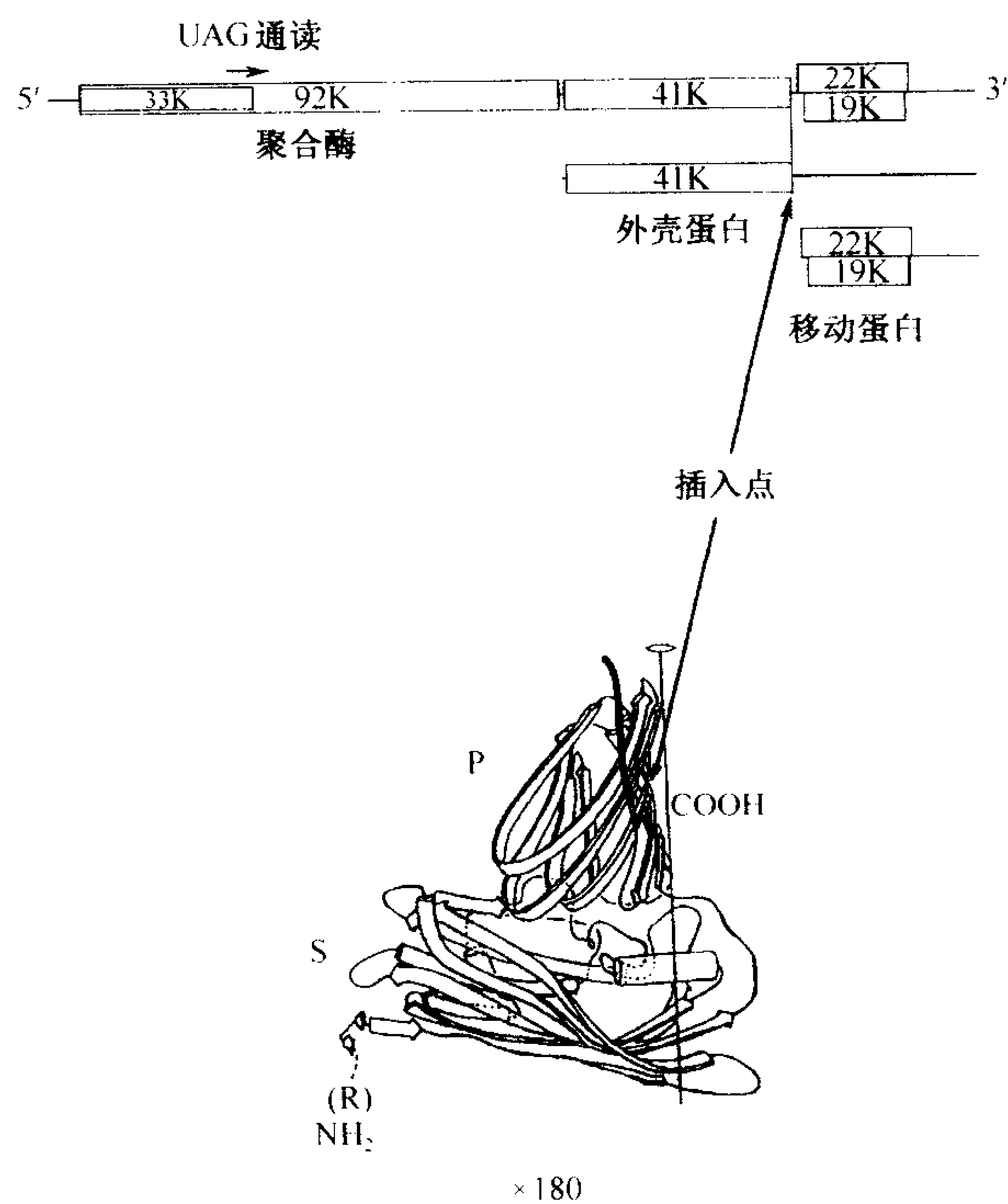
D. 植物功能基因组研究中利用的病毒

第10章第Ⅳ节E中已介绍了由病毒侵染引起的植物基因沉默。在病毒诱导的基因沉默（VIGS）（图10.18）中，将一个基因整合到一种病毒载体中，称之为基于TMV的载体（Kumagai *et al.*，1995）、基于PVX的载体（Ruiz *et al.*，1998）或基于TGMV的载体（Kjemtrup *et al.*，1998）。这些病毒载体可使植物中的一种同源基因沉默。正如在第10章第Ⅳ节F中介绍的一样，一些病毒可抑制PTGS，但它们对VIGS不起作用。VIGS现象最初是显示转入基因的沉默，目前表现出可使植物的各种基因，如八氢番茄红素脱氢酶（phytoene desaturase）基因（Ruiz *et al.*，1998）、镁螯合酶（magnesium chelatase）基因沉默（Kjemtrup *et al.*，1998）。Baulcombe（1999）提出VIGS途径可以作为从基因组序列中鉴定基因功能的一种手段。目前插入突变的方法有各种缺点，如无法鉴定基因，而该基因的破坏在转基因植物形成前是致死性的。而采用VIGS途径，死亡现象可从接种后成熟植株的死亡率中明显看出。因此病毒载体是功能基因组研究中的一个有力工具。

E. 小结与讨论

这节的讨论将展示病毒并不总是引起问题，其中一些病毒还有用途。除了用于基因技术，一些病毒对一些作物品种在园艺上具有正面的重要性，这些作物品种是通过其病毒病症状得以鉴定和命名的。感染苘麻花叶病毒（AbMV）的红脉苘麻品种Tompsonii（*Abutilon striatum* cv. Tompsonii），由于该病毒引起的彩斑而使其具有吸引力（类似于彩色图版3.7）。同样地，忍冬品种Aureo-reticulata（*Lonicera japonica* cv. Aureo-reticulata）由于呈现忍冬黄脉花叶病毒（HVCMV）引起的症状而受人喜爱。

已证明植物病毒在基因技术上有广泛的用途，前面已介绍了其中一些的基本方法。其中影响最大的是在转基因构建物中运用病毒控制序列和利用病毒载体来表达外源序



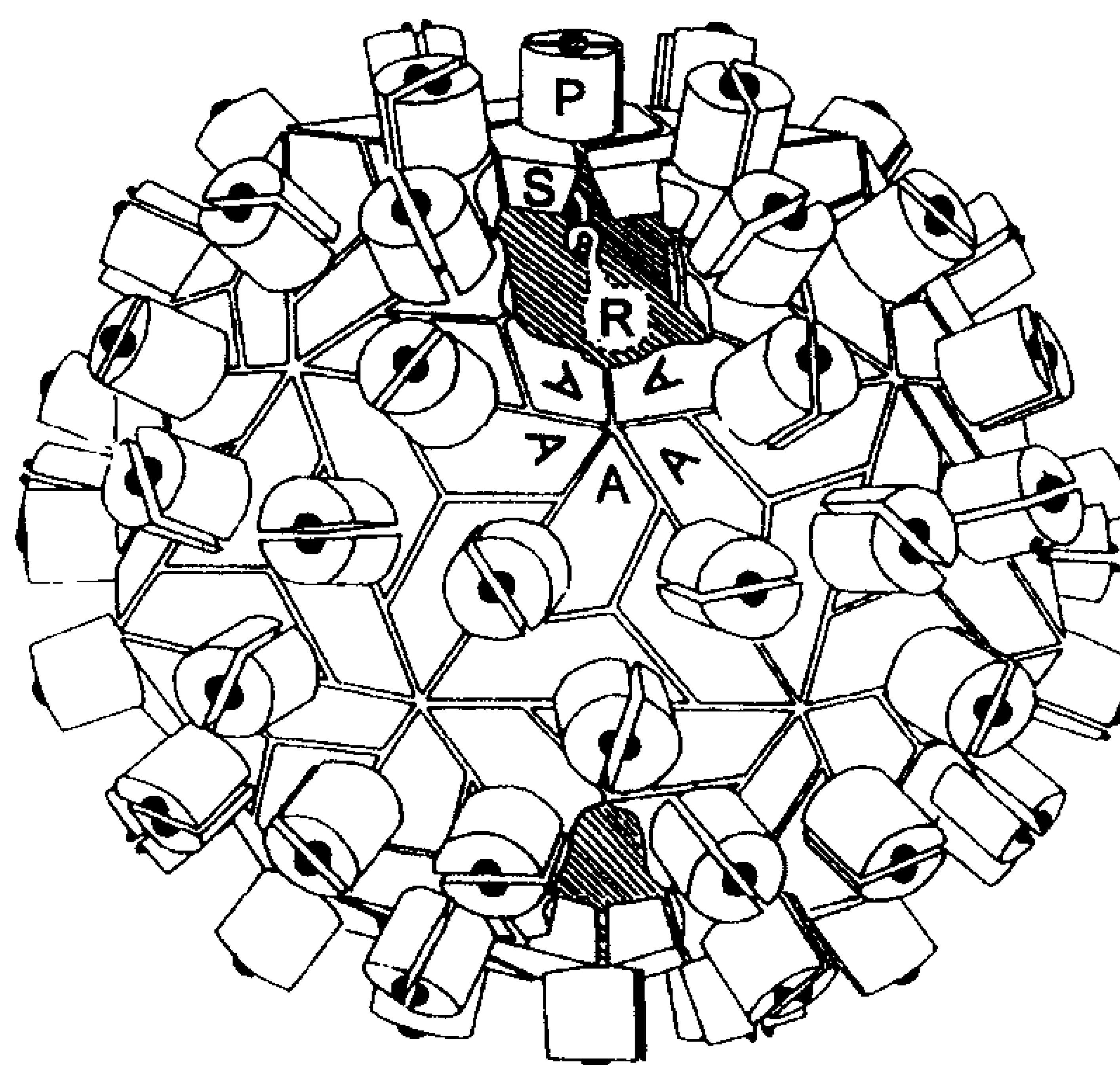


图 16.20　嵌合 TBSV 粒体的形成。异源序列融合体通过在病毒基因组全长 cDNA 克隆的 CP 基因 3′端插入获得，CP 通过两个大的亚基因组 mRNA 翻译表达，其具有 3 个结构域，分别称为 R、S 和 P；P 域具有外源氨基酸（显示为黑色）。当 180 个 CP（标记 A）装配形成多面体时，融合的肽段（显示为黑色半环）正好显露于病毒粒体的表面。承蒙版权所有者（©John Willey and Sons Ltd）惠允，引自 Porta 和 Lomonossoff（1998）。

列。虽然 VIGS 在功能基因组学研究中的应用还不普遍，但具有很大的潜力。

Scholthof 等（1996）将利用病毒作为表达载体的方式分成 4 类（图 16.21）。前面已介绍了其中的多数方法，在 Scholthof 等（1996）的综述中可以找到更多细节。

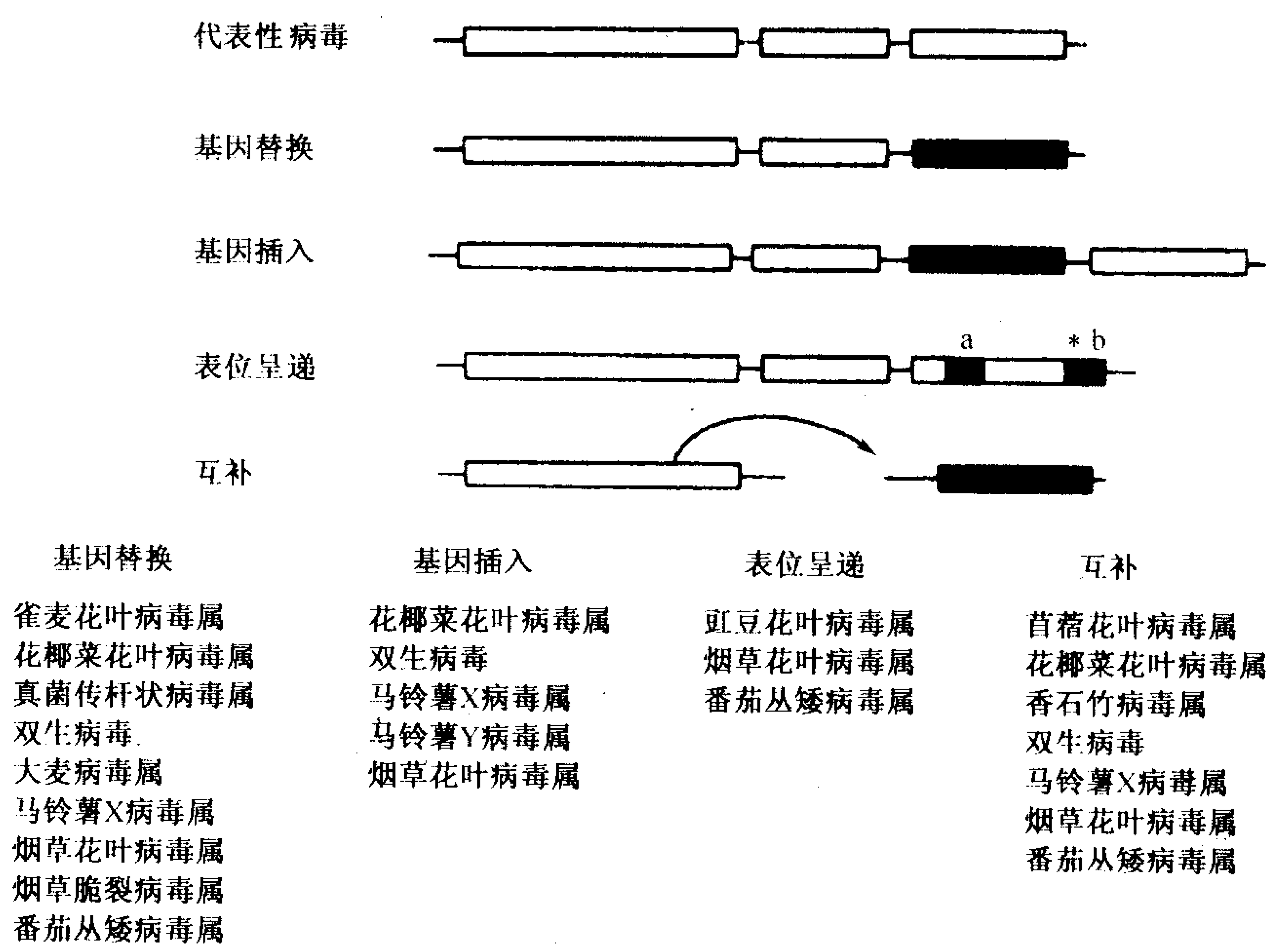


图 16.21 不同病毒表达外源基因（黑框）策略的比较。白框表示病毒基因。抗原决定簇表示方法：CP 基因内融合小段序列的翻译（a）或在 3′端琥珀终止密码子 *（amber stop codon）的通读翻译（b）。承蒙版权所有者（©Annual Reviews. www. AnnualReviews. org）惠允，引自 Scholthof 等（1996）。

DNA 植物病毒没有像预期那样用作为基因载体。其中有几个原因，包括高重组率、病毒基因功能的密切整合及包装限制。但是这些病毒为转基因构建物提供了重要的控制序列，对那些需要组织特异性表达的情况尤其如此。

虽然最初认为 RNA 病毒在非选择性条件下复制存在着积累错误的问题，但目前的研究已证明并非如此。与球状病毒相比，杆状病毒有一个重要特点，即它们对包装大大延长了的病毒基因组没有限制。理论上，杆状病毒在包装上没有核苷酸大小的限制，但今后也许会发现这方面的限制。

植物病毒在生物活性肽和疫苗的生产上有很大的潜力。但是必须知道它们在商业化应用方面有各种限制因素。这些限制因素包括要减少病毒引起的症状，这样寄主不会受到过分伤害，同时要防止经过修饰的病毒扩散到别的作物上，以防这些作物发生严重病害；还要控制从体内含有修饰病毒的作物向人类食品和动物饲料中的扩散；还要对修饰病毒进行质量控制，检测任何非功能性的突变体。

第17章　植物病毒的变异、进化和起源

像其他生物体一样，复制过程中产生的子代病毒本质上与亲本相似，但能够通过变化（变异）产生新的类型或“株系”（strain）。这种内在的变异可以使病毒适应新的、不断变化的环境。经过更长一段时间新病毒开始出现，而且过去一定有一个原祖型（archetypical）病毒出现的时期。

就许多类群的生物而言，对于其进化途径（evolutionary pathway）的了解可以通过研究不同地质时期的化石记录来获得，但是病毒没有留下传统形式的化石。然而，关于植物病毒（和其他病毒）的分子信息正在不断地增加，这种信息可以称为“分子化石”（molecular fossil）信息。尽管如此，我们有关病毒进化途径的知识仍然是相当零碎的。但无疑病毒已经发生、而且仍在继续发生有时还是非常快速的进化上的改变。新株系为这种变化提供了原材料。

从植物病理学家的观点来看，在田间存在、能够引起不同病害的各种病毒株系通常在生产上是非常重要的问题。因此，需要用可靠的标准来区分和鉴定不同的株系。基于这些原因，病毒株系的研究就成为植物病毒学研究的一个有趣而重要的方面。

本章将论述植物病毒的变异（variation），以及如何利用这些信息来理解病毒的起源和进化。

第Ⅰ节　病毒的株系

A. 准种（quasispecies）

正如在第2章第Ⅰ节C.2部分指出的，病毒的种不是一个完全一致的种群（population），而是一个准种。理解准种的概念是理解病毒变异和进化的基础；Eigen（1993）、Domingo等（1995）、史密斯等（1997）、Domingo（1999）与Domingo等（1999a）曾详细地讨论过准种的概念。准种这一术语是指密切相关的基因组的集合（collection）经过连续不断的遗传变异（genetic variation）、竞争和选择而形成的一个种群结构（population structure）。突变体或变株（variant）的分布通常以一个或几个主序列（master sequence）为中心。选择平衡（selection equilibrium）处于亚稳定状态，当具有优势的突变体出现时，该平衡可能发生崩溃或改变。在这种情况下，早先的准种将会被一个新的准种所代替。这个新的准种具有新的主序列和新的突变体谱（mutant spectrum）。一个准种的稳定性依赖于病毒基因组中遗传信息的复杂性（complexity）、基因组复制过程中拷贝的保真性（fidelity）以及主序列的优越性。

准种有物理学、化学和生物学3个方面的定义。在物理学定义中，一个准种可能被

看作序列空间（sequence space）中的一团云（cloud），在理论上代表着一个基因组序列所有可能的变株。

就一个基因组长达 10 kb 的 ssRNA 病毒而言，其序列空间是 4^{10000}。因此，准种云只代表序列空间的非常小的一部分，而且受到基因和核酸功能的需求的限制。在化学上，准种为相关但不相同的基因组的定额分布（rated distribution）。在生物学上，一个准种是种群的表型表达（phenotypic expression），而且很可能被主序列的表型表达所支配。

B. 病毒株系

在第 2 章第 I 节 C 中讲过病毒种的定义，如上所述，病毒种本质上是序列空间中的一团云。这使得给株系下一个严格的定义即使是可能的，也非常困难。然而，我们必须界定种内的变株，而且事实上我们必须采取一个比较务实的态度。我们必须仔细权衡其分类特征，以便促进进一步分类和人们之间的交流。这种交流不只在病毒学家之间，而且也包括植物病理学家、技术推广工作者、农民和许多其他团体之间的交流。这一点可以由两个例子来阐明。

甜菜西方黄化病毒（*Beet western yellows virus*，BWYV）是一种黄症病毒科病毒（luteovirus），在美国寄主范围广，包括甜菜；而在欧洲侵染甜菜的 BMYV 多年来一直被认为是 BWYV 的一个株系（Waterhouse *et al.*，1988）。

当意识到与 BWYV 亲缘关系十分相近的欧洲的这种黄症病毒并不侵染甜菜，而在油菜中却相当普遍时，就引起了混乱。

这使得我们必须费尽口舌向农民解释为什么在越冬的（overwintering）油菜上的 BWYV 并不侵染来年种植的甜菜。de Miranda 等（1995）对欧洲、伊朗和美国等国家的 38 个 BWYV* 和 BMYV 分离物的核苷酸序列进行了分析，鉴定出了 3 个明显不同的序列组（sequence group）。第一组包含了可以同时侵染油菜和甜菜的分离物，第二组只能侵染油菜，而第三组只能侵染甜菜。据此提出建议，应将第一组和第二组命名为 BWYV（可以称为 BWYV-1 和 BWYV-2），将第三组命名为甜菜轻型黄化病毒（*Beet mild yellowing virus*，BMYV）。

第二个例子是，RTBV 有两个主要的株系或分离物组群，一个分布于东南亚，另一个在印度次大陆（Druka and Hull，1998）。这两个株系在核苷酸序列上约有 25％的差异，在氨基酸水平上有 12 ％～40％ 的差异（取决于具体的可读框）（Hull，1996）。

因此，如果依据马铃薯 Y 病毒属病毒的分类标准（见下文），这两个株系应该被认为是两种不同的病毒。

然而，这些株系引起相同的症状，而且以相似的方式与其介体传播辅助病毒 RTSV 产生交互作用。所以，如果给以上两个株系命名不同的名字，农民和推广人员就会感到很困惑，但是对于植物病毒学家来说，指明它们是不同的株系是很有意义的。

---

* 原文有误，错印为 BYMV——译者。

第Ⅱ节 鉴定株系的标准

病毒的种可以简单地定义为具有相似特性的株系的集合（collection）。有时我们想知道两个相似的病毒分离物是否相同；而在其他场合我们必须确定两个分离物是属于不同的病毒种还是同一种病毒的不同株系。有两个特征可用于不同病毒株系的识别和界定：①基于病毒粒体自身特征和组分的结构标准；②基于病毒、寄主植物及其昆虫或其他介体三者之间的各种互作的生物学标准。这些标准在第2章中介绍病毒分类的一般问题时讨论过。血清学特征是以病毒蛋白的结构为基础的，然而由于其在实际应用中的重要性，将在下面B部分介绍血清学标准。

A. 结构标准

1. 核酸

a. 病毒RNA基因组的异质性（heterogeneity）

如上所述，所有已研究过的RNA基因组并不是以单一核苷酸序列存在，而是围绕共同序列（consensus sequence）分布的序列变株。在特定病毒株系中的大多数变株通常都在不同的位点发生碱基置换，可能还有核苷酸的缺失或增加。可是，当多分体基因组的一个或多个片段不处在选择压力（selection pressure）之下的时候，就会发生更多的实质性变异。变株可能很快会出现，这可能导致株系鉴定的混乱。例如，BNYVV的基因组RNA 3和RNA 4能够编码真菌在土壤中传播该病毒所必需的功能（参见第11章第Ⅻ节B）。当从受侵染的甜菜叶子上分离病毒时，在甜菜里可能没有选择压力来维持这些基因的完整性，会得到大范围的缺失突变体（Burgermeister *et al.*，1986）。当把核酸差异作为鉴别病毒株系的标准时，必须记住这种快速变化的可能性。

b. 评估核酸亲缘关系的方法

i. 核苷酸序列

核苷酸序列提供了关于病毒之间亲缘关系远近的重要信息。即使测定相当短的序列也能提供很有用的信息。然而，要有效地研究病毒株系间的亲缘关系，必须测定至少一个（最好是几个）分离物的核苷酸全序列。

在早期的关于核苷酸序列的研究中，序列直接由标记的病毒RNA来测定，未检测到以前曾经注意到的微异质性（microheterogeneity）。通常，测定的序列是特定培养物的共同序列（consensus sequence）(Swinkels and Bol，1980）。当把RNA病毒的cDNA克隆用来测序的时候，获得的序列可能（或许很偶然地）包含着非典型的共同序列。这种可能性可以通过测定涵盖该基因组中同一部位的多个克隆的序列来核实。同时还应注意在从病毒粒体RNA合成cDNA时可能由反转录酶造成的序列错误（Brachio *et al.*，1998）。

为了保证测定的序列为有功能的基因组序列，有必要使用已证明具有侵染性的DNA克隆（Lazarowitz，1988）或者可以转录成侵染性RNA的DNA克隆（Dawson *et al.*，1986）。当把核苷酸序列视为病毒株系之间亲缘关系的衡量标准时，我们必须记住

序列差异的程度和分布可能会因所研究的病毒以及被检测病毒基因组的哪一部分而有较大的变化。举例如下：

（1）3 个 PVY 株系和两个 WMV-2 株系的衣壳蛋白基因和 3′非翻译区分别有 83%和 92%的同一性（identity）（Frenkel *et al.*，1989）。

其中有几簇非同一的核苷酸集中分布，但是大部分或多或少地随机分布于所研究的整个序列中。

（2）与此形成对比的是，4 个 PPV 株系和 2 个 TEV 株系的衣壳蛋白和 3′非翻译区有 97%～99%的同一性（Frenkel *et al.*，1989）。

同样，在 7 个 AMV 株系的 RNA 4 中，39 个核苷酸的 5′端前导序列除了在第 26 个核苷酸位置发现 A、G 或 U 残基以外，其余的核苷酸是相同的（Swinkels and Bol，1980）。具一个或多个识别功能的序列可能通常是高度保守的。例如，根据 3′非翻译区序列的同源性，有人提出 PepMoV 应被视为 PVY 的一个株系（van der Vlugt *et al.*，1989）。然而，鉴于以上例子，我们应该记住，某些序列尤其是 5′端和 3′端对于控制基因组的复制和表达是非常重要的，因此这些区域比起其他区域来说变异就少一些。

ii. 杂交

核酸杂交实验可提供关于不同病毒分离物的核酸之间碱基序列同源性程度的有价值的信息，但这些信息可能并不能直接说明问题。核酸杂交的基础理论依据已在第 15 章第Ⅴ节 C 部分中详细论述过。

杂交程序的一个显著优点是可以在总基因组 RNA，或 RNA 片段之间做一个比较。这一点与血清学试验不同。例如，血清学试验通常比较衣壳蛋白上的抗原位点的差异，而对于许多病毒来说，衣壳蛋白仅代表了总基因组的 1/10 或更少。然而，不同株系之间核酸同源性的程度将取决于各种不同的实验因素，如杂交条件的严紧性（stringency）以及不配对核苷酸的酶切去除的条件等（图 17.1）。图 17.1 还显示了以半定量方式应用点印迹（dot blot）得到的结果。

Koenig 等（1988a）发现，定量点印迹杂交为区分密切相关的、用血清学测验几乎不能区分的病毒提供了非常灵敏的方法。另一方面，他们还注意到在不同的分类组群的病毒之间一些意想不到的交叉杂交（cross-hybridization）。这些交叉反应或许起因于真正的碱基序列的相似性（这在不同组群的病毒间发现过），或者起因于随机引发的 cDNA 的使用。

iii. 异质性作图

异质性作图（heterogeneity mapping）是以 RNA 杂交为基础的，这种方法可以用来检测发生比例比较高的单个点突变。该方法利用了核酸酶（RNase）A 的识别和切除异源双链 RNA 分子中的单碱基错配的能力（Winter *et al.*，1985）。标记的负链 RNA 探针是从 RNA 的 cDNA 克隆转录而来。经过与供试的 RNA 杂交以及 RNase A 和 T 的消化，基因片段通过 PAGE 分离开并确定大小。该方法已经用于估测 CMV 的株系间（Owen and Palukaitis，1988）及其卫星 RNA 间（Kurath and Palukaitis，1989 b）的异质性程度和位置，使评价 RNA 分子的整个种群主要位点的异质性成为可能。与此形成对比的是，单个克隆的序列测定可以提供占病毒种群的一小部分的关于几个分子的详细而准确的信息。通过电泳迁移率可以区分从不同病毒分离物 cRNA 转录物得到的异

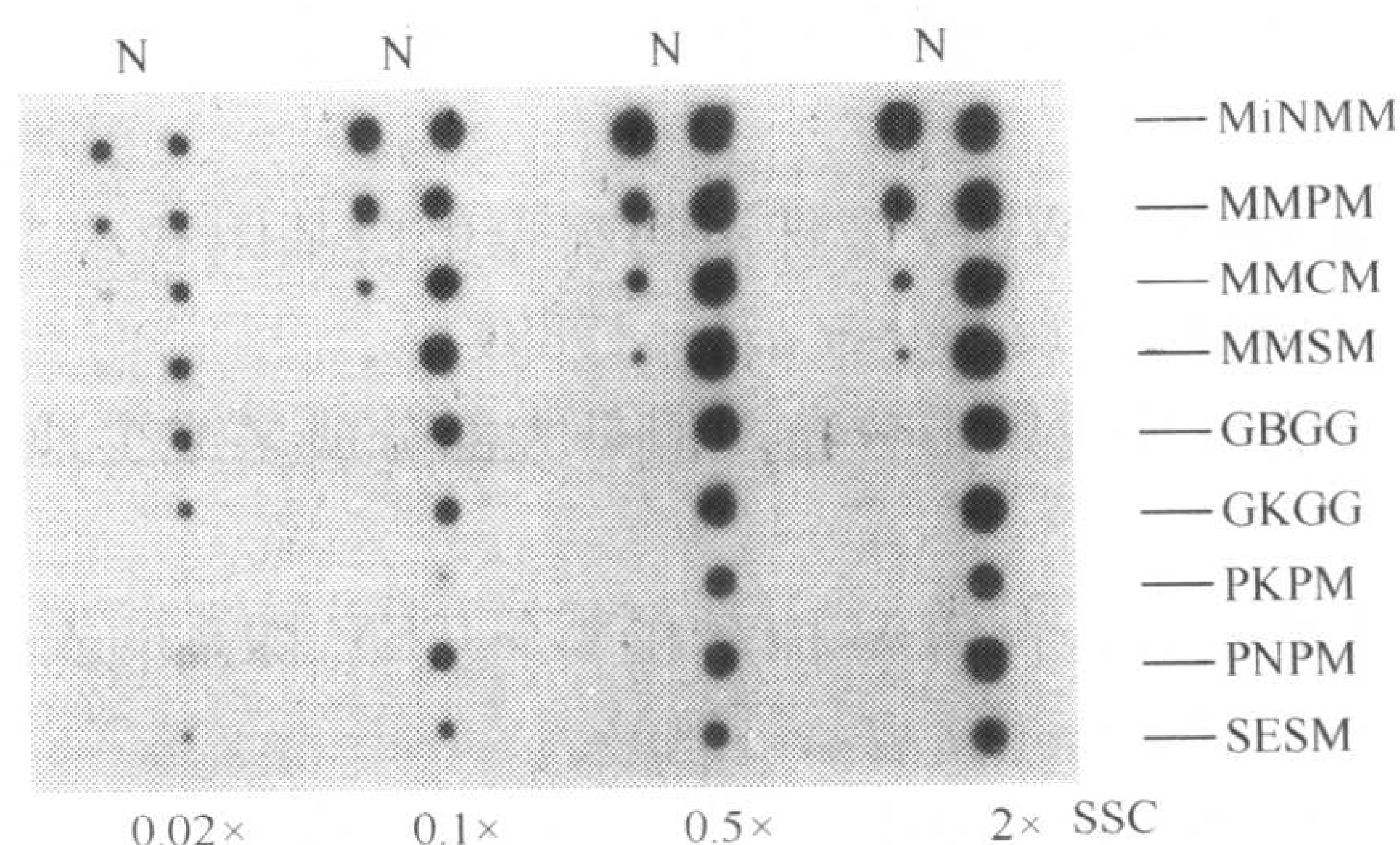


图 17.1　利用点印迹技术估计一种病毒不同株系间的亲缘关系。放射自显影表明了 MSV-MNM 和 MSV 其他株系间的序列相似性程度。每个样品点到 4 张相同的滤膜上，右边是供试验的不同 MSV 株系 DNA（2 ng），左边是 2 倍稀释的 MSN-MNM（N）作为对照（2 ng～7.8 pg）。先用经过缺口平移（nick translation）的 MSV-MNM（N）全长克隆杂交，然后用不同严紧度（离子强度）的缓冲液（0.02×、0.1×、0.5×和 2×SSC，65℃）洗涤滤膜。经允许，引自 Boulton 和 Markham（1986）。

源双链体（heterologous duplex）的多态性（Rosner *et al.*，1999）。这一方法能够区分 PNRSV 的不同分离物。

iv. 限制性片段长度多态性（RFLP）

用限制性核酸内切酶切割双链 DNA 能够揭示其多态性。双链 DNA 可以直接从 DNA 病毒或由 RNA 病毒经反转录产生的 cDNA 直接获得。这项技术通常用来检测病毒基因组之间的差异（Hull，1980；Kruse *et al.*，1994；Villegas 1997），但也可用来证明基因组之间的相似性。

v. 单链构象多态性

单链构象多态性（single-strand conformation polymorphism，SSCP）分析是检测基因组之间差异（或相似性）的一个有效方法。当双链 DNA 的正链和负链由于热处理而分开的时候，它们会形成亚稳定状态的序列特异性的折叠结构，这种结构可以在非变性聚丙烯酰胺凝胶中通过电泳迁移率的不同来检测（Orita *et al.*，1989）；甚至一个核苷酸的变化在合适的条件下也可以检测到。有人用非同位素标记的一种 SSCP 分析法比较了 BNYVV 基因组之间的差异（Koenig *et al.*，1995）。SSCP 和 RFLP 都可用病毒 RNA 经反转录 PCR 得到的产物来测定。

vi. 基因组核酸的其他性质

病毒核酸的大小可能因病毒株系的不同而异，如 TRV 的不同分离物就是如此（Cooper and Mayo，1972）。有人用限制性内切酶图谱来研究一些花椰菜花叶病毒属病毒和杆状 DNA 病毒属病毒的 dsDNA 基因组的特征（Hull and Donson，1982；Villegas *et al.*，1997）。

c. 附加的基因

TRV 的 TCM 株系的 RNA 2 比已测序的其他株系（如 PSG 株系）的 RNA 2 大许

多。Angenent 等（1986；1989 b）指出，该 RNA 分子较长的原因部分是由于 3′端来自 RNA 1 的长约 1099 个核苷酸的重复（包括一个 16 kDa 的可读框），部分是由于这一条 RNA 2 所特有的一个 29 kDa 的可读框（图 6.38）。这一 29 kDa 的可读框和 PSG 株系 RNA 1 上 28.8 kDa 的可读框之间没有显著的同源性，其起源和功能（如果有的话）还不确定。

d. 株系的亚群（subgroup）

当对足够多的病毒株系测序以后，可以通过比较核苷酸序列之间的亲缘关系来界定这种病毒株系的亚群。例如，根据竞争性杂交实验的结果，PSV 的 30 个株系可被分为两个组，这两个组之间几乎没有同源性，然而每个组内却有着广泛的同源性（Diaz-Ruiz and Kaper，1983）。同样，CMV 株系也被进一步划分为亚群（参见第Ⅴ节 C.4）。

e. 碱基序列数据的局限性

一个特定碱基的置换、缺失或增加可能因为其环境的不同而对其编码的蛋白质有不同的影响。以下因素可能很重要：

（1）由于遗传密码的简并性，许多碱基置换并不会引起其编码的氨基酸的变化。例如，从 TMV L 株系上衍生出来的 L11A 中有 10 个碱基置换，其中 7 个发生在密码子第三位碱基的位置，因而不影响氨基酸序列（Nishiguchi *et al.*，1985）。

（2）一个给定的碱基置换可能使一种氨基酸变成具有相似特性的另一种氨基酸，这几乎不引起蛋白质的改变。另一种情况是，它也可能变成差别很大的其他类型的氨基酸（例如，从一个脂肪族的侧链到一个芳香族的侧链），就会产生一个物理特性改变了的有活性的蛋白质，或成为一个不能存活的无功能的突变体。

（3）一个碱基的缺失或增加会引起移码突变，其影响大小取决于突变是发生在基因的始端还是末端，会不会有第二个突变（增加或缺失）使可读框恢复正常，以及该部分核酸编码几种蛋白质。

（4）在将碱基序列数据应用于分类时，一个更为普遍的问题是基因组的某些部分和某些产物可能有多种功能。基因组的某些部分可能只编码一个多肽，而其他部分则可能编码不止一个多肽；有一些多肽可能有一种以上的功能。基因组的一些部分可能同时有编码和控制或识别功能；其他的部分可能仅有调控功能。此外，一个基因的突变可能影响另外一个基因的表达。例如，TMV 突变体 L_{II} A 推定的聚合酶基因的突变造成了细胞间移动蛋白（30 kDa）合成的减少，从而降低了该株系的移动效率（Watanabe *et al.*，1987b）。

因此，即使我们已经知道一系列病毒株系的全部碱基序列，如果我们只使用这些序列而不用其他信息来确立亲缘关系的远近，那仍然是不明智的。以前曾经有人认为，我们的终极目标是建立完全基于核苷酸序列的病毒分类方案（Gibbs，1969）。现在已经很明显，核酸碱基序列数据的重要性只能从生物学的观点结合基因组组构、基因组各部分及其产物的功能与互作方面的知识来判断。侵染性克隆和分子生物学技术的应用将有助于碱基序列和生物学变异之间关系的确定。

2. 结构蛋白

病毒的外壳蛋白和其他结构蛋白对于病毒和需要界定病毒和病毒株系的植物病毒学

家都很重要。小 RNA 病毒的外壳蛋白经过进化，一定在 3 种重要功能之间达到了良好的平衡。

（1）围绕 RNA 进行自装配的能力；已知有些突变体即使在正常温度下也缺少这一功能。例如，TMV 的 PM2 株系不能与 RNA 形成杆状结构。在 pH 5.2 的条件下，该蛋白质在体外凝聚成长的、开环、弯曲的螺旋状结构，而不是紧凑的杆状（Zaitlin and Ferris，1964）。

（2）完整病毒粒体在细胞内以及在传播到新鲜寄主植物过程中的稳定性。

（3）蛋白衣壳解装配到一定程度以便能释放出可供转录和翻译的 RNA。没有这一功能的变株在自然界中不能存活。例如，Bancroft 等（1971）描述了一个被亚硝酸诱导的、在细胞内不能脱壳的 CCMV 突变体，尽管用酚法从病毒中提取的 RNA 侵染性很强，但该突变体没有侵染性。

对于小 RNA 病毒而言，外壳蛋白对于界定病毒和病毒株系特别重要。除了这一蛋白质的内在特性（体积、氨基酸序列、二级和三级结构）外，该病毒的许多其他可测量的结构特性主要或完全依赖于外壳蛋白。这包括血清学特异性、病毒的结构特征、电泳迁移率、阳离子结合和对各种因子的稳定性等。因此，根据衣壳蛋白特性确定病毒株系组群内亲缘关系的观点可能存在严重偏见。另一方面，如果在自然界的株系进化过程中，非外壳蛋白基因（non-coat protein gene）中的突变或多或少地与外壳蛋白以同样频率发生，那么这种对于亲缘关系的观点可能就有其合理的基础。

我们将用马铃薯 Y 病毒属（*Potyvirus*）来说明病毒衣壳蛋白的特性在界定病毒株系中的作用。马铃薯 Y 病毒属病毒是在分类上最难研究的病毒组群之一。该组病毒约占所有已知植物病毒的 1/10。病毒侵染的寄主范围很广，在自然界中以许多株系或致病型（pathotype）存在，它们在寄主范围和病害严重度（disease severity）等生物学特性上有一定的差异。

有些研究者认为，马铃薯 Y 病毒属病毒的株系可能在两个或更多的病毒间形成连续谱（continuous spectrum），使得病毒和株系群体的界定工作非常困难或根本不可能。然而，对几种病毒和许多株系的衣壳蛋白氨基酸序列的比较结果表明，这一方法对该组内的病毒分类非常有用（Shukla and Ward，1989 a，b）。他们对一系列病毒和株系之间 136 种可能的配对分析的结果表明有明显的双峰分布（bimodal distribution），即不同病毒间的平均序列同源性为 54%，不同株系间的平均同源性为 95%（图 2.2）。这些数据并不支持在马铃薯 Y 病毒属病毒中有“连续谱”这一观点。不同病毒间的主要差别在于它们衣壳蛋白长度的不同（图 17.2）。氨基酸序列的主要差异在蛋白质的 N 端附近，而 C 端一半则高度同源。另一方面，不同的株系有非常相似的 N 端。

这一模式的两个例外似乎说明，以前对某些马铃薯 Y 病毒属病毒分离物的分类结果是错误的。血清学试验表明 PeMV 和 PVY 的亲缘关系很远，但图 17.2 中的序列数据明确证明 PeMV 应该是 PVY 的一个株系。SMV-N 和 SMV-V 以前都被认为是 SMV 的株系，但在证明它们的序列同源性只有 58%后便被认为是两种不同的病毒（Shukla and Ward，1988）。在这两种情况以及其他情况下，在确定病毒种的分类地位时必须采用一些实用的方法。

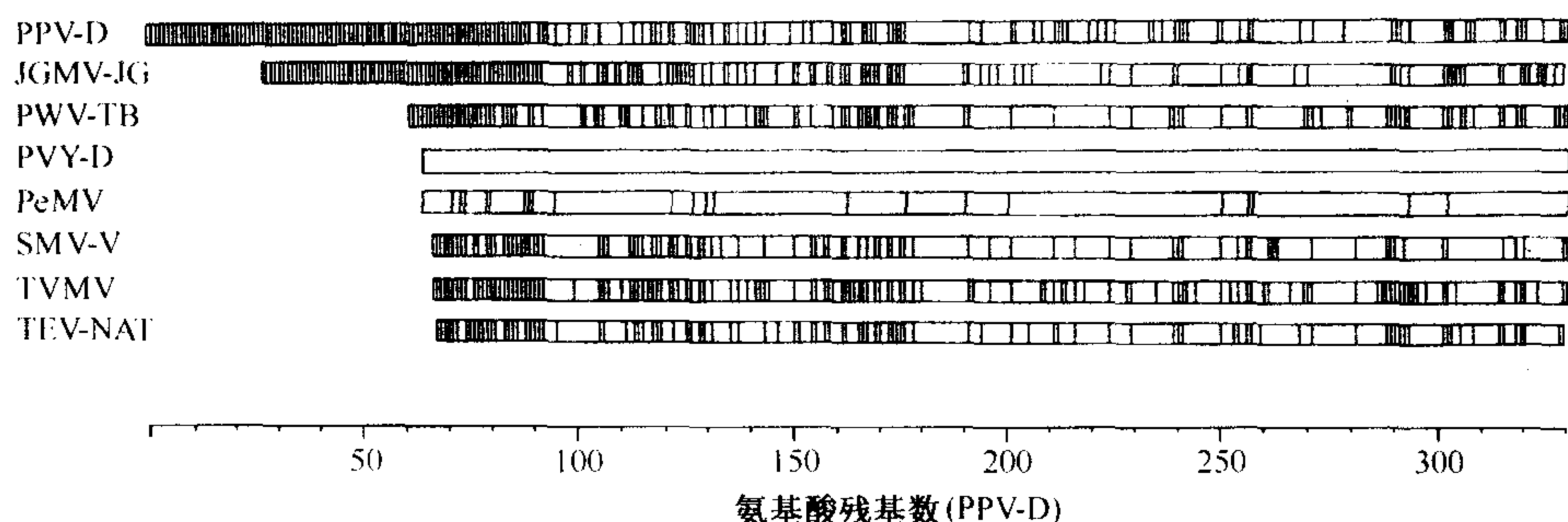


图 17.2 马铃薯 Y 病毒属 7 个不同的成员和 PeMV 氨基酸序列差异的示意图。这些序列分别与该属典型成员 PVY-D 株系的序列加以比较。PeMV 的衣壳蛋白序列与 PVY 的非常接近。经允许，引自 Shukla 和 Ward (1988)。

对胰蛋白酶消化肽段（tryptic peptide）的高效液相色谱（HPLC）分析可能对区分马铃薯 Y 病毒属病毒及其株系有所帮助（Shukla *et al.*，1988a）。这一技术不能提供氨基酸序列的详细信息，但它最大的价值可能在于方法的简便易行。

番茄丛矮病毒属（*Tombusvirus*）病毒外壳蛋白上的突出（projecting，P）域中氨基酸序列的变异程度比结构（structural，S）域的变异程度更大（Hearne *et al.*，1990）。因此，暴露的表面具有更大的变异性可能是植物杆状病毒和二十面体病毒的一个共同特征。

3. 非结构蛋白

病毒编码的非结构蛋白不常用于界定病毒的株系。Mayo 等（1982a）从 RpRSV 或 TBRV 不同株系 VPg 的胰蛋白酶消化肽段中没有检测到任何差异。Atabekov 和 Dorokhov（1984）曾提及 TMV 一些株系中 30 kDa 蛋白质的氨基酸序列差异很大。根据肽作图（peptide mapping），PYDV 的两个血清型（serotype）——SYDV 和 CYDV 的 4 个结构蛋白被分到两个组中。不同株系之间蛋白质 M 和 N 的差异很少，而 M2 和 G 则显著不同（Adam and Hsu，1984）。

4. 不同类型病毒粒体的比例

一个病毒的不同株系或一个属内的不同病毒在提纯病毒制剂或粗提液中沉降速率不同的病毒粒体之间的比例可能会差异很大，可分为以下 3 种类型：

（1）上部组分（空的蛋白质外壳）的相对量。例如，对芜菁黄花叶病毒属病毒而言，TYMV 空衣壳和病毒核蛋白的比例一般在 1：2～1：5，OkMV 空衣壳和核蛋白的比例为 10：1～15：1。即使是密切相关的株系，如 RCMV 的株系，在这一特性上也有差异（Oxelfelt，1976）。对于一些多分体病毒来说，上层组分的比例取决于一种 RNA 分子的功能。

（2）多分体病毒（如 AMV）的不同株系装入衣壳内的核酸组分的比例不同（van Vloten-Doting *et al.*，1968）。同样，核蛋白的比例可能受到特定 RNA 分子的控制。

（3）特定株系可能会产生异常病毒粒体类型。Hull（1970a）曾描述过 AMV 的一个分离物大量产生比 B 组分长的粒子。

应当记住，粒子类型的比例可能受病毒株系以外因子的影响。它们包括：①接种后的时间；②寄主种类；③环境条件；④耕作制度，如 TYMV 空蛋白外壳的比例在受侵染的原生质体中比在整个叶组织中高；⑤分离病毒的程序。

5. 其他的结构特征

a. 病毒粒体的构造（architecture）

相关的病毒可望有非常相似的体积、形状和亚基的几何排列（geometrical arrangement）。然而，在几组相关的株系内已发现粒子形态上的显著差别。像 TRV（Cooper and Mayo，1972）和 BSMV（Chiko，1975）等螺旋对称病毒的不同株系间，杆状粒子长度不同的现象很常见。有时结构上的变化看上去是"异常的"，尽管病毒的那个株系有生活力。因此，TMV 的 Dahlemense 株系衣壳蛋白的组装过程会发生螺旋的周期性紊乱（Caspar and Holmes，1969）。有些 AMV 株系包括一些异常长的粒子，它们的直径正常，但含有不止一个 RNA 分子（Hull，1970a；Heijtink and Jaspars，1974）。

b. 电泳迁移率

一种病毒的电泳迁移率首先取决于蛋白质的氨基酸组成，其次取决于三维结构，后者影响到电离基团（ionizing group）的可得性（availability）。迁移率还取决于所用缓冲液中存在的离子。蚜虫传播性（aphid transmissibility）不同的 PEMV 分离物在电泳行为上也不一致（Hull，1977b）。

c. 稳定性和密度

在小 RNA 病毒中，稳定性和密度的差异已经用于区分病毒的株系。病毒 RNA 的含量可能因株系的不同而异，从而影响在强盐溶液中的浮力密度（Lot and Kaper，1976）。然而，外壳蛋白的不同通常导致稳定性或密度的差异。

B. 血清学标准

在第 15 章第Ⅳ节中曾讨论过抗原和抗体的性质、血清学试验的基础及其优点和局限性。下面将介绍如何用血清学标准来界定病毒和病毒株系。

1. 一般性的考虑

a. 血清学关系的存在与否

血清学试验为确定两个病毒分离物是否相关提供了一个有用的标准。第 15 章中描述的任何一个试验都可应用，但最普遍应用的是经过改进的沉淀反应或 ELISA 测试。只要足够谨慎，血清学试验可以为病毒分类提供有价值的证据。

如果两个病毒分离物有一定程度的血清学关系，它们很可能会有许多共同的性质，并属于相同的组群。但也有一些尚不能解释的例外。已有的各种实例表明，某些病毒无疑属于同一组，但无血清学交互反应，如芜菁黄花叶病毒属（*Tymovirus*）的 TYMV 和 EMV。在测定血清学关系的试验中，可能会发生下述潜在的错误：

（1）病毒的抗血清可能有与寄主组分（如大量的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶蛋白质）

反应的抗体。

（2）粗提液中寄主材料的非特异性沉淀。

（3）病毒抗原的非特异性沉淀，尤其在高浓度的情况下。

（4）抗原制剂和其他病毒的污染。

（5）病毒在分离过程中发生改变。我们应该记住，病毒在分离过程中可能会发生影响血清学特异性的改变。

（6）非交互的阳性反应（non-reciprocal positive reaction）。要证明两种病毒血清学上不相关，必须制备这两种病毒的血清。需要证明一种病毒只能与自己的血清发生反应，而不与异源血清反应。这种交互试验（reciprocal test）是必需的。因为两种病毒可能有亲缘关系，但可能因为提取液（extract）中浓度太低而不能表现出阳性反应。阴性的单向测试（one-way test）没有多大价值。如下文所述，最好使用高效价抗血清去证明确实没有血清学关系。

（7）从田间采集到的分离物可能是几种不同血清型的混合物（Dekker *et al.*，1988）。这些考虑特别适用于应用多克隆抗血清（polyclonal antisera）的情况。使用单克隆抗体（MAb）可以避免几个这样的问题，但是如在第Ⅱ节 B. 3. b 部分所讨论的，它们有其自身的局限性。

b. 血清学关系的程度

i. 在一群病毒株系之间

大量的实验工作已致力于研究株系的相关程度，并尝试将血清学特性与其他生物学和化学特性结合起来。病毒株系的界定对于任何一个旨在培育一种寄主的抗病品种的项目中都特别重要。

如果一个病毒的两个分离物是完全相同的，无论用什么形式的血清学试验方法，它们都会与彼此的血清产生同样的反应。然而，如果它们虽然有亲缘关系，却明显不同，则会发生一定程度的交互反应（至少用多克隆抗体试验时会观察到），但反应不会完全一致。有各种不同类型的血清学试验可以用来鉴定和区别病毒株系。表 17. 1 中有这样的一些例子。

表 17. 1　用于描述病毒和病毒株系的血清学方法

方法	病毒或病毒属	参考文献
间接 ELISA	芜菁黄花叶病毒属、番茄丛矮病毒属、豇豆花叶病毒属、烟草花叶病毒属、马铃薯 X 病毒属、香石竹潜隐病毒属、马铃薯 Y 病毒属	Koenig (1981)
$F(ab')_2$ ELISA	香石竹潜隐病毒属	Adams 和 Barbara (1982)
琼脂双向扩散、ELISA 和 SSEM	黄瓜花叶病毒属	Rao 等(1982)
定量火箭免疫电泳	PMV	Berger 和 Toler(1983)
电泳印迹免疫分析	芜菁黄花叶病毒属、番茄丛矮病毒属、豇豆花叶病毒属、线虫传多面体病毒属、烟草花叶病毒属、马铃薯 X 病毒属、香石竹潜隐病毒属、马铃薯 Y 病毒属	Burgermeister 和 Koenig(1984)

续表

方法	病毒或病毒属	参考文献
直接或间接 ELISA	等轴不稳环斑病毒属和 AMV	Halk 等(1984)
各种 ELISA 方法	GFLV 的株系	Huss 等(1987)
间接 A 蛋白-夹心 ELISA	烟草花叶病毒属病毒和病毒株系	Hughes 和 Thomas(1988)
间接 ELISA	MSV 分离物	Dekker 等(1988)
免疫捕获 PCR	PVY^{NTN}和 CCSV	Weidemann 和 Maiss(1996)
		Hoffmann 等(1997)

当只研究 2 个或 3 个病毒分离物的时候，只要你在技术上谨慎，无论你要确定这些分离物是否在血清学上相关、它们是否完全相同，或它们是否表现出不同程度的亲缘关系等，都比较容易做到。使用同一套分离物和同样的抗血清，可以得到可重复性的(reproducible) 结果。例如，可证明株系 A 和 B 密切相关，二者与株系 C 亲缘关系都较远。然而，当需要测试大量的相关株系时，情况可能变得十分复杂。并且株系越多，株系之间的关系研究就越没有意义。

ii. 实验变量

有许多重要的实验变量（experimental variable）能影响所估计的病毒和株系之间血清学关系的程度。这包括下列各项：①一个主要的实验变量来源是抗血清的变异性(variability)，既包括从同一个动物不同批次采集的血清，也包括从不同动物个体采集的血清。在长达几个月的时间内，从同一只动物分不同批次采集的抗体中能发生交叉反应抗体的比例可能会差异很大（Koenig and Bercks，1968）。②两个病毒株系的抗血清交互反应的程度通常与血清中抗体的量相关。低效价的血清表现出较低的交互反应能力，高效价的血清表现出较强的交互反应能力。因此，要用多克隆抗体检测密切相关的病毒之间的血清学差异，最好使用低效价的抗血清。要证明比较远的血清学关系，可能有必要用高效价的血清。③许多用于免疫和抗体分析的病毒制剂可能含有不定量的空衣壳蛋白，处于聚合的各种中间状态或变性状态。完整病毒的衣壳蛋白可能由于蛋白酶解(proteolysis) 而失去部分氨基酸。与这些不同形式的衣壳蛋白反应的抗体可能，或者不能，给出与完整粒子的抗体同样的亲缘关系结果。在第Ⅱ节 B.4 部分关于马铃薯 Y 病毒属的介绍中有这样一个例子。用于检测和分析交互反应及株系特异性抗体的方法可能会影响亲缘关系的明确程度。表 17.1 中列出的参考文献中有这样的例子。

c. 血清学区分指数

尽管有这些变量，通过从许多动物中连续取血测定以及合并这些血清加以测定等方法，还是可以得到有关血清学相关程度的有价值的评估。多数血清学相关程度的定量测定都使用沉淀效价（precipitation titer）来进行的。在这样的测试中，血清学交互反应能力的程度可以用血清学区分指数（serological differentiation index，SDI）来表示(van Regenmortel and von Wechmar，1970；参见第 15 章第Ⅳ节 A. 3. d)。SDI 值等于用负 log 2 表示的这些效价的差异。例如，这种重复的比较已经应用于几组烟草花叶病毒属病毒（van Regenmortel，1975）和芜菁黄花叶病毒属病毒的研究（Koenig，1976)。

ELISA 也可用来计算 SDI 值，作为测定病毒或病毒株系之间血清学相关程度的指

标（Jaegle and van Regenmortel，1985；Clark and Barbara，1987）。表 17.2 给出了从 ELISA 和沉淀试验获得的 SDI 值的比较结果。通过 ELISA 得到的成对病毒的交互 SDI 值有差异，而且这些值的平均值与通过沉淀得到的 SDI 值并非密切相关。尽管如此，两种测试均清楚地表明，CGMMV 与其他的烟草花叶病毒属病毒具有实质上的不同。

表 17.2 利用 ELISA 和沉淀试验计算出的血清学区分指数（SDI）比较烟草花叶病毒属病毒

烟草花叶病毒属病毒		根据 ELISA 计算的 SDI			根据沉淀试验计算的平均 SDI	病毒衣壳蛋白序列相似性 %
x	y	y 抗 x	x 抗 y	平均值		
TMV	ToMV	1.4	0.5	0.9	1.2	82
U2	ToMV	0.6	1.9	1.3	1.9	70
TMV	RMV	2.0	1.2	1.6	2.1	44
TMV	U2	2.4	1.9	2.1	2.7	74
ToMV	RMV	1.9	0.7	1.3	4	47
U2	RMV	3.5	2.5	3.0	4.5	46
RMV	CGMMV	7.0	6.4	6.7	5	30
U2	CGMMV	2.6	8	5.3	6	33
TMV	CGMMV	5.4	6.9	6.2	6.8	36
ToMV	CGMMV	5.7	6.9	6.3	7	33

承蒙版权所有者（Elsevier Science）惠允，引自 Jaegle 和 van Regenmortel（1985）。

Clark 和 Barbara（1987）介绍了一个更精炼的能可靠地分辨 SDI 值小到 0.2 的病毒株系之间的 ELISA 试验计算 SDI 值的统计学方法。

2. 血清学反应中病毒组分的作用

没有足够的证据表明植物病毒的 ssRNA 可以激发 RNA 特异性的抗体。用一种植物病毒注射动物后形成的抗体只能与该病毒的蛋白质（在完整病毒中或作为完整病毒衣壳的各种部分降解产物）反应。Fraenkel-Conrat 和 Singer（1957）曾证明过蛋白质的这种作用。他们对血清学上不同的 TMV 株系进行了混合重建（reconstitution）试验。人工杂种病毒（artificial hybrid virus）具有包被 RNA 的蛋白质的血清型，但是侵染后产生的子代病毒的蛋白质仍然是 RNA 编码的。

然而，病毒 RNA 可能在刺激产生对病毒外壳抗体的过程中发挥某种次要的作用。完整 TYMV 的免疫原性（immunogenicity）显然比不含 RNA 的同一病毒的空蛋白外壳的免疫原性较强（Marbrook and Matthews，1966）。这种差异在用几种注射途径的兔和鼠中都已发现，该差异在初次免疫应答的整个时程（time course）都存在，在对第二次注射的再次免疫应答中也能发现。同时注射分离的 TYMV RNA 并不能增加空蛋白外壳的免疫原性。从侵染性病毒在体外得到的人工空蛋白外壳的免疫原性并不比天然的空外壳强。

没有侵染性的 TYMV 核蛋白的免疫原性和侵染性病毒的免疫原性一样。因此，核蛋白免疫原性的增强一定是由于粒子内 RNA 的存在而导致的。病毒核蛋白免疫原性的增强是否是植物病毒的一个普遍特征尚无定论。TMV 的免疫原性似乎比蛋白质杆或亚

基的都强（Marbrook and Matthews，1966；Loor，1967）。病毒粒体内的 ssRNA 刺激免疫原性的机制还不清楚。

双链 RNA（dsRNA）可以有免疫原性。dsRNA 的抗血清与 dsRNA 反应，但不与 dsDNA 或单链核酸反应。该抗血清对特定的双链核酸缺乏特异性（参见第 15 章第Ⅳ节 A.2）。我们有几个理由期望完整病毒（如 TMV 和 TYMV）及其蛋白亚基或亚病毒聚合体（subviral aggregate）具有不同的抗原位点：

（1）完整病毒上的某些抗体结合位点可能由两个或多个亚基暴露在表面的部分组成。这样的位点在分离的亚基中不存在。

（2）亚基或许有特征性的结合部位，它们在亚基组装成完整外壳时会被掩盖。

（3）当几个亚基聚集的时候会发生构象变化（conformational change），以致亚基组装后暴露在表面的构型（configuration）可能与作为单体（monomer）时的不同。

所有这些现象的例子在植物病毒及其蛋白亚基中都存在。

3. 界定病毒和株系的步骤

a. 分析方法

在第 15 章（第Ⅳ节 B）中介绍过用于病毒检测和分析的各种血清学方法。这些方法大多曾应用于界定病毒和病毒株系。表 17.1 中列出了一些例子。该列表反映了 ELISA 已经成为界定病毒和株系的最受欢迎的方法这一事实。

b. 单克隆抗体

第 15 章（第Ⅳ节 D）中总结了单克隆抗体（MAb）用于病毒分析、检测和诊断的优点与缺点。MAb 界定病毒株系的突出价值在于，它们的分子均一性（同质性）确保了在一个特定反应中只有一个抗原决定簇参与。

这种单一互作的高度特异性是多克隆抗体所不可比拟的，如果用多克隆抗体，会有许多的其他反应。如果能够找到可识别两个病毒株系之间微小抗原变化的 MAb，就可以得到重复性很好的精确区分。虽然不同 MAb 区别单个氨基酸替换的能力差别很大，有些 MAb 有可能能够做到这点（Al-Moudallal *et al.*，1982）。

然而，使用 MAb 有一些局限性：①MAb 和病毒蛋白的单体之间通常不能产生免疫沉淀（immunoprecipitation）。②MAb 经常对除垢剂或抗原结合到 ELISA 板上时产生的微小构象变化过于敏感（Dekker *et al.*，1987）。③在一组病毒株系中，不同 MAb 的相对反应能力可能变异很大。例如，TMV 06 株系与 TMV 普通株系的不同之处在于外壳蛋白的第 9、65 和 129 位的残基发生了改变。在图 17.3 显示的测试中，这一株系与 MAb a 的反应跟 TMV 一样，与 MAb c 的反应比 TMV 强，与 MAb b 根本不反应。④MAb可能是异种特异的（heterospecific），也就是说，它们与用来免疫的病毒之外的其他抗原的反应可能会更强烈（参见第 15 章第Ⅳ节 D）。株系 06 与 MAb c 的反应比 TMV 强烈，但该 MAb 就是用 TMV 免疫获得的（图 17.3）。

如果在为分离 MAb 而进行杂交瘤筛选时，获得的克隆只与作为免疫原（immunogen）的病毒株系来测试，与这一株系亲和力低的 MAb 可能因为检测不出来而被抛弃。其中一些 MAb 可能是检测其他株系非常有用的克隆。因此，当筛选株系特异的 MAb 时，用一系列结构相关的免疫原来筛选是非常重要的。

用MAb界定株系的另外一种潜在的局限是两个株系可能有共同的、完全相同的抗原决定簇。如果MAb的特异性碰巧是针对这一个决定簇的，即便这几个株系其他部位的决定簇有本质区别，它们看起来也是相同的。例如，ToMV-Y株系是ToMV株系群的一个成员，其外壳蛋白氨基酸序列与TMV有18%的差异。这两个病毒可以很容易地用多克隆抗体区分开，但不能用一些MAb区分开（如图17.3中的抗体c）。

这些局限说明了制备一系列不同的MAb对于界定病毒和株系的重要性。针对ToMV的实验将会进一步说明这个问题。该病毒的株系被认为在血清学上是相当一致的。该病毒的10个MAb以同样的方式与ToMV的15个株系和分离物反应。然而，其中两个与TMV和RMV有交叉反应（Dekker *et al.*，1987）。

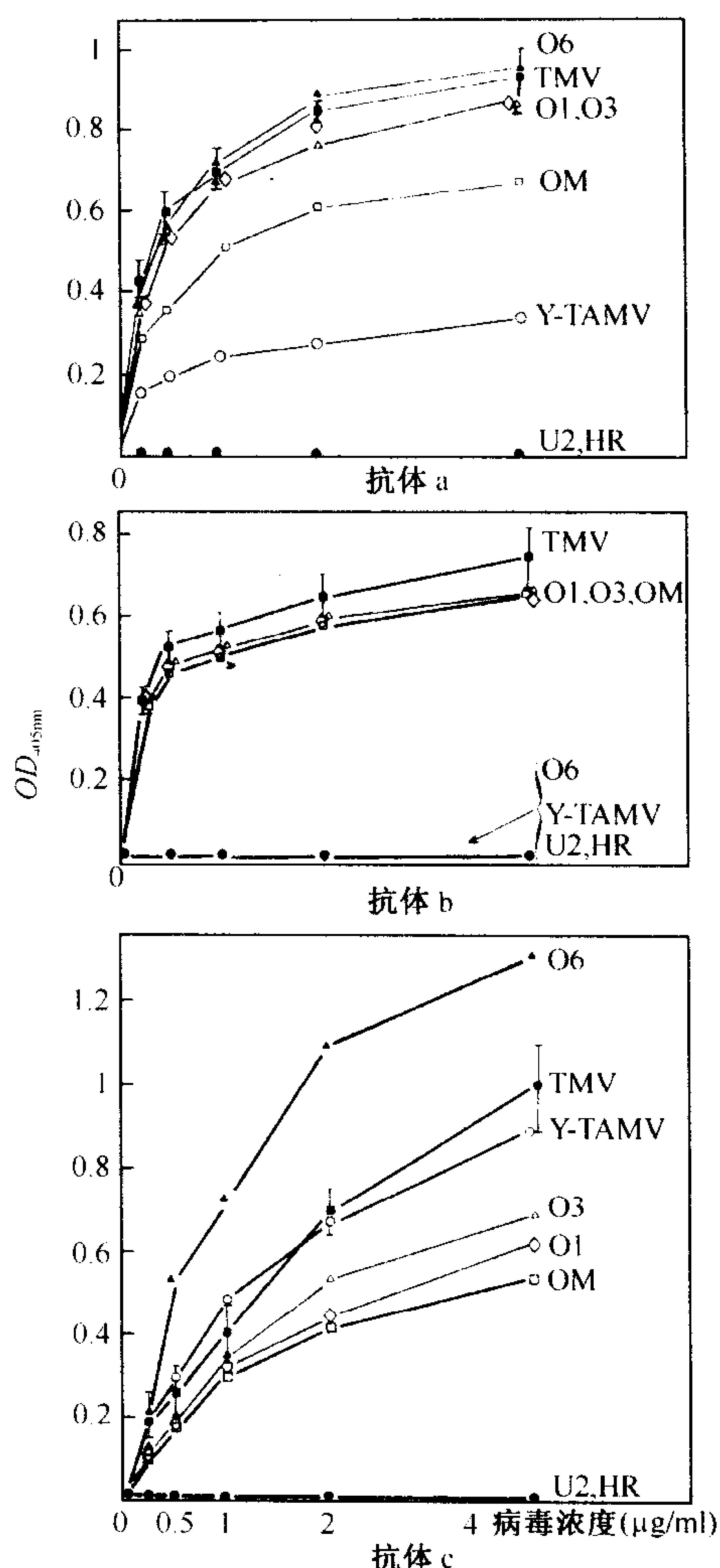


图17.3 利用以TMV作为免疫原获得的3种MAb（a、b和c）通过间接ELISA检测烟草花叶病毒属的病毒。株系O1、O3和O6是兰花株系，OM是TMV的普通日本株系；Y-TAMV是番茄花叶病毒株系；U2和HR是两种不同的烟草花叶病毒属病毒。承蒙版权所有者©Blackwell Science Ltd.惠允，引自van Regenmortel等（1984c）。

4. 用血清学方法界定病毒和株系时用到的抗原位点

鉴于其在亚基间键合（bonding）中的关键作用，组成特定病毒的外壳或杆的蛋白亚基的面可能需要受到一定程度的约束，以使氨基酸的置换不妨碍亚基保持其功能。对于RNA-蛋白质互作也非常重要的杆状病毒（以及某些等轴对称的病毒）尤其如此。我们可以预期，组成病毒表面的蛋白亚基的那一部分受的限制会少些，这样就提供了完整病毒的一些抗原位点（antigenic site）。这种观点已经在马铃薯Y病毒属的成员中得到了证实。

生物化学和免疫学的证据显示TEV N端的29个氨基酸是亲水性的，并且位于或靠近病毒表面（Allison *et al.*，1985b）。用胰蛋白酶对马铃薯Y病毒属6种病毒的粒体进行温和蛋白酶解的结果表明，衣壳蛋白的N端和C端暴露在粒体的表面。胰蛋白酶降解的结果是从N端降解掉30～67个残基，从C端去掉18～20个残基，降解掉的具体长度取决于病毒种类（Shukla *et al.*，1988b）。蛋白酶解后留下了完全装配的、包含着由216个或218个氨基酸组成的蛋白质核心的侵染性病毒粒体。用多克隆抗血清进行电泳印迹免疫分析（electroblot immunoassay）的结果表明，马铃薯Y病毒属病毒特异的抗原位点位于对胰蛋白酶有抗性的核心蛋白质

区域。因此，用解离的核心蛋白质制备的抗体应该与大多数马铃薯Y病毒属病毒反应。另一方面，位于表面的N端是马铃薯Y病毒属特定病毒的外壳蛋白有较大的独特区域，而且大多数病毒特异的抗体应当与这一区域反应。这与从氨基酸序列数据得到的结果是一致的，即马铃薯Y病毒属病毒衣壳蛋白的N端是变异最大的区域（图17.2）。我们以前就知道，马铃薯Y病毒属病毒在保存过程中会发生部分降解。使用部分降解的病毒作为免疫原或用于抗原性分析，可以解释为什么文献中会出现一些有关马铃薯Y病毒属病毒血清学关系相互矛盾的报告（Shukla *et al.*，1988b；图2.3）。

Shukla等（1989a）建立了下面的简单步骤以除去具有病毒组特异性的、交互反应的抗体。用赖氨酰内肽酶（lysyl-endopeptidase）可以除去一种马铃薯Y病毒属病毒衣壳蛋白上病毒特异性的N端。然后将被截短的外壳蛋白偶联到溴化氰（cyanogen bromide）活化的琼脂糖（凝胶）（Sepharose）上。不同病毒的抗血清都通过这样一个层析柱，产生交叉反应的抗体就会被吸附。不能结合上去的抗体只能与同源病毒或其株系反应，就像用电泳印迹免疫分析的结果一样。

该程序的实用性已经通过在澳大利亚和美国侵染玉米、高粱和甘蔗的、分类处于混乱状态的17个马铃薯Y病毒属病毒分离物得到验证（Shukla *et al.*，1989b）。结果表明，这17个株系属于4种不同的马铃薯Y病毒属病毒，即JGMV、MDMV、SCMV和SrMV。

用天然的（native）或截短的（truncated）（除去N端）外壳蛋白进行的电泳印迹免疫分析，可以筛选出单克隆抗体以明确它们是病毒组特异的或是病毒种特异的。利用这一程序，可以从与两个或更多病毒反应、有时甚至与所有15种供试的马铃薯Y病毒属病毒都反应的MAb中，将对一种病毒特异的MAb筛选出来（Hewish and Shukla，转引自Shukla and Ward，1989b）。

使用ACMV、ICMV和OLCV的一系列MAb，获得了许多粉虱传的双生病毒（geminivirus）的（抗原）表位分布图（epitope profile）（Swanson *et al.*，1992；Konaté，1995；Harrison *et al.*，1997）。这些分布图说明，有些MAb与几种病毒反应，有些MAb是病毒甚至是株系特异性的。图17.4绘出了12种菜豆金色花叶病毒属病毒（begomoviruses）的抗原表位分布图。

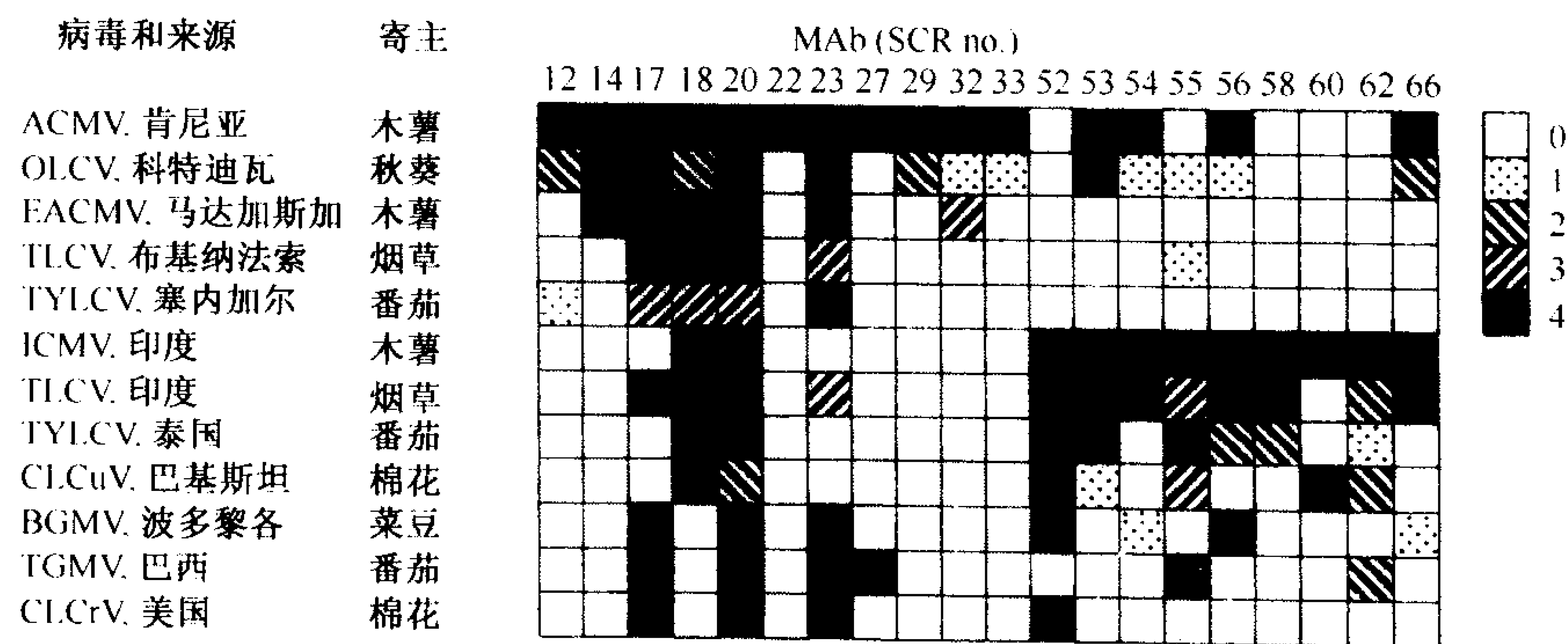


图17.4 来自6种寄主的菜豆金色花叶病毒属12种病毒的抗原表位分布图。该图表明了不同大洲相同寄主上病毒的差异，以及同一大洲不同寄主上病毒的相似性。反应强度从观察不到（0）至非常强（4）。承蒙版权所有者［©Annual Reviews (www.AnnualReviews.org)］惠允，引自Harrison和Robinson（1999）。

5. 针对特定抗原决定簇的抗体的制备

Geysen 等（1984）介绍了一种在固体支撑物上快速、同时合成数百个肽的方法。其纯度足可用于 ELISA 测试。使用一系列这样的肽和一种病毒的抗血清可以确认病毒上的有免疫学重要性的氨基酸序列。这一个步骤已经被成功地应用于针对马铃薯 Y 病毒属病毒的多克隆抗血清和单克隆抗体的分析（Shukla *et al.*，1989c）。这一工作使利用与特定抗原位点对应的合成肽（synthetic peptide）作为免疫原制备对病毒组特异、病毒特异，甚至是对株系特异的血清探针（serological probe）成为可能。Berzofsky（1985）讨论过与预测重要氨基酸序列有关、影响抗原位点的内在（intrinsic）和外在（extrinsic）因素。在噬菌体粒子表面从克隆的 cDNA 上表达单链（single-chain）可变片段的能力（参见第 15 章第Ⅳ节 E）为获得高度特异的抗体提供了另一种方法。

6. 针对非结构蛋白的抗体

非结构蛋白的变异有时也可以用于界定株系。例如，Chang 等（1988a）根据细胞核内含体蛋白的血清学反应来研究一系列马铃薯 Y 病毒属病毒和其株系间的关系。

7. 株系特异抗血清的其他用途

除了可应用于建立植物病毒间关系的血清学试验外，对株系特异的抗血清还可作为重要试剂用于各种实验。例如，对 ToMV 株系特异的抗血清已经用来检测 ToMV 的弱株系接种番茄后对野生株系再度侵染的保护效果（Cassells and Herrick，1977a），以及研究交互保护的机制（Barker and Harrison，1978）。

应用株系特异的抗血清已证明，当烟草叶片原生质体受两个 TMV 株系双重侵染时，有些子代病毒的粒体含有两种衣壳蛋白的混合物（Otsuki and Takebe，1976b）。有人用对 TMV 株系特异的抗体来研究表现型混合的病毒粒体在体内和体外形成的条件（Atabekova *et al.*，1975；Taliansky *et al.*，1977）。Purcifull 等（1973）用对几种马铃薯 Y 病毒属病毒表现出株系特异性的抗血清证明，每一个株系诱导形成的内含体中的蛋白质是独特的，与病毒衣壳蛋白无关，并且与病毒增殖的寄主种类也没有关系。Otsuki 等（1977）用株系特异性抗体出色地证实了 TMV 装配的起始位点和方向。

C. 生物学标准

1. 症状

a. 宏观症状

正如前面提及的，症状差异对于突变体株系的识别尤为重要。然而，病害症状的差异程度是衡量不同株系间相关程度的一种非常不可靠的尺度。不同病毒株系在同一种类和品种的寄主植物上产生的症状可能有无症状的“带毒者”（carrier）状态、严重程度不同的花叶病至致死性的坏死病害。图 17.5 表明了 TSV 的 4 个株系在烟草上产生的系统症状类型的范围。这些株系的亲缘关系非常近，在它们之间可以进行重配（reassortment）实验。

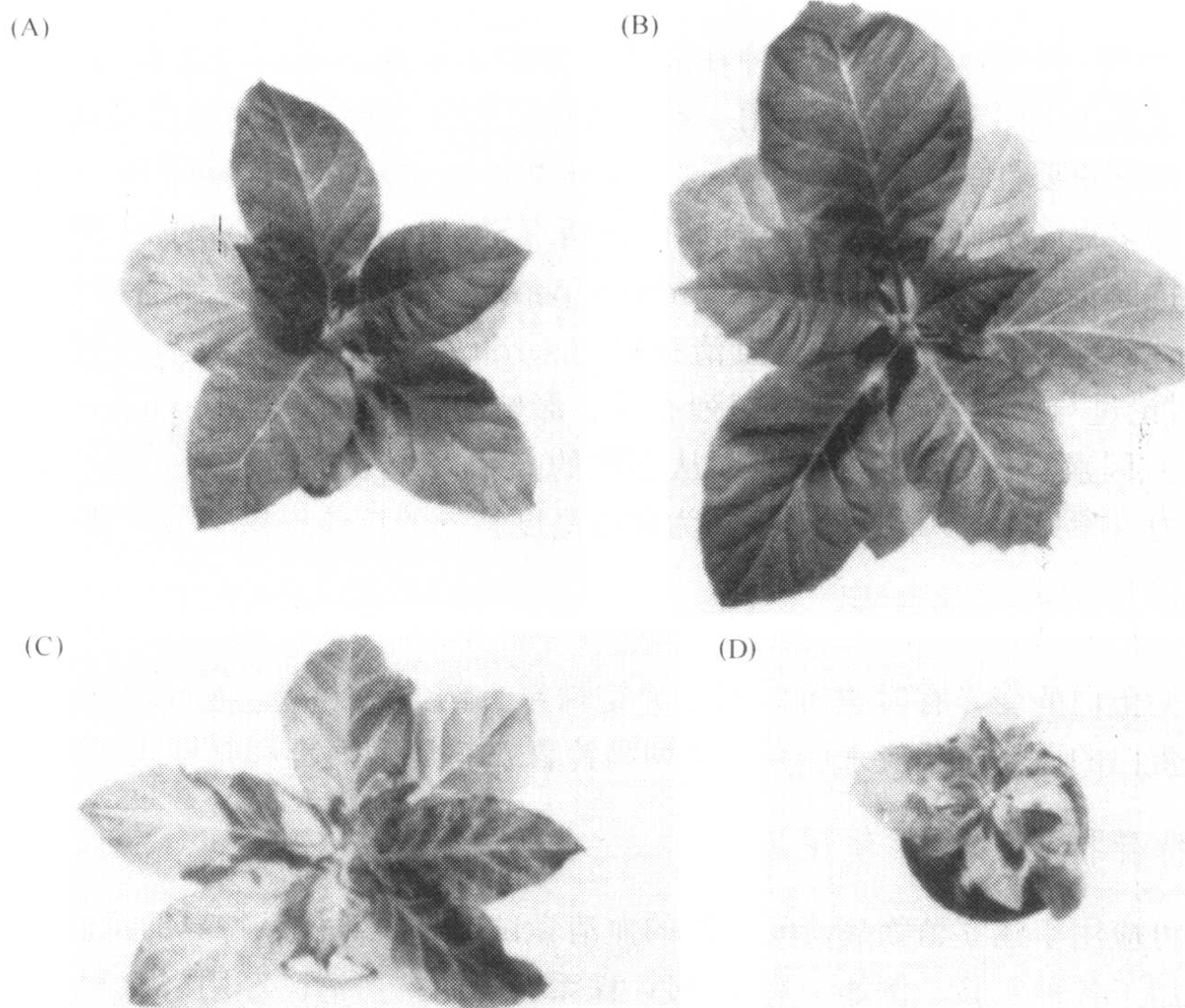


图 17.5　病毒基因组对病害表达的控制作用。4 个 TSV 分离物在烟草上引起的慢性病害症状的差异。(A)“标准”的北美株系。烟草基本无症状；(B) 在叶片上造成锯齿状边缘的株系；(C) 使烟草持续表现花叶或坏死的株系；(D) 引起严重慢性矮化的株系。这些症状类型可以通过人为地交互重配不同株系的上部、中部和下部组分来得到 (Fulton，1975)。承蒙 R. W. Fulton 惠允，引自 Matthews (1991)。

一组特定株系在一种寄主植物上产生的病害可能与在另外一种寄主上形成的病害没有任何相关性。大多数病毒，包括广泛发生的 TMV、PVX、PVY、AMV 和 CMV 等，在自然界中有大量的株系。许多主要根据症状和其他生物学特性描述的“新”病毒后来被证明只是这些普遍发生的病毒之一的株系。有些病毒根据症状来看只产生很少几个株系，如一些马铃薯品种上的 PLRV 。

一些能产生不同局部斑反应的植物品种可以成为特别有用的鉴别寄主，能快速界定一种病毒的田间分离物中的株系。然而，必须设法控制环境条件对局部斑反应的重要影响。

一种引起严重病害的病毒通常被描述为比引起轻型病害的病毒有更强的“毒力”(virulent)。根据其他章节所述，这样的描述只适合于一个给定的病毒株系以特定的方式接种到特定品种的寄主植物上，并在特定环境条件下生长的情况。

一个已经定名的寄主植物品种，尤其是一个栽培时间很长的品种，对一个特定病毒株系的反应可能变异很大，原因之一是不同地区的种子供应商在繁种时可能会做出不同的选择。这使得根据在已定名的栽培品种上产生的症状进行株系鉴定更加复杂。尽管如此，在标准条件下对几种寄主种类或品种上产生的症状进行系统的研究非常有助于界定

一种病毒的大量田间分离物中的株系。

b. 细胞学影响

一种病毒的不同株系诱导产生的细胞学变化通常很容易区分。差别有 3 种类型：①对细胞器的影响；②病毒诱导产生的细胞内结构；③在细胞内病毒粒体的分布或聚集状态。这种差异在界定病毒和病毒株系中的作用会越来越大。然而，其他因素可能引起株系之间差异程度的变化。例如，TYMV 的储用培养物（储存毒种）（stock culture）中的不同株系对系统感染叶片细胞内的叶绿体有明显不同的影响（图 9.18），但是这些不同在表现局部斑的细胞中就不是那么明显或者不存在。

TuMV 不同株系的柱形内含体在形态上有差异（McDonald and Hiebert，1975）。

受 BYDV 不同株系侵染的燕麦细胞核和细胞质的超微结构变化因株系而有不同，这些株系中有些对某个特定蚜虫介体有专化性，其他株系对特定蚜虫介体没有专化性（Gill and Chong，1979）。

AMV 不同株系的粒子在感病细胞内的聚集方式有很大不同（Hull *et al.*，1970；Wilcoxson *et al.*，1975）。在受花椰菜花叶病毒属病毒（caulimoviruses）侵染的细胞中发现了典型的病毒质（viroplasm）（图 8.24），它们可能会因株系的不同而异（Givord *et al.*，1984；Stratford *et al.*，1988）。这种变异可能与基因Ⅱ的差异以及基因Ⅱ和Ⅳ产物的比例有关。BYDV 的两个变株混合侵染燕麦后对微管束组织的影响形式包括木质部受到侵染的诱因（predisposition）有所改变（Gill and Chong，1981）。

2. 寄主范围和寄主植物基因型

病毒的寄主范围已经在第 3 章第Ⅴ节中概括性地讨论过。一种病毒的许多株系可能有非常相似的寄主范围，但是其他的一些可能差别很大。

如果一系列寄主植物基因型对两种病毒分离物的反应都相似，这就提供了它们是相关株系的好证据（Schroeder and Provvidenti，1971）。另一方面，失去侵染一个特定寄主的能力可能是因为一个单一突变所致。Dahl 和 Knight（1963）用亚硝酸处理得到了 ToMV 的 12 个突变体。其中的一个株系已经失去了侵染番茄的能力。

一种病毒的寄主范围不同的一些株系在有些共同寄主上产生的病害症状通常不一样。但情况并不总是如此。例如，TMV 的 4 个株系不能根据它们在烟草（*N. tabacum*）或番茄（*Lycopersicon esculentum*）的普通品种上的症状明确区分开，但可以根据它们在一系列番茄属（*Lycopersicon*）寄主上的寄主范围区分开，其中包括番茄的两个品种和秘鲁番茄（*L. peruvianum*）的 3 个选择株（selection）（McRitchie and Alexander，1963）。依照它们对多种寄主植物基因型的反应，可以把 PVX 的株系分组（Cockerham，1970）。

3. 传播方法

不同的节肢动物介体种类或同一种类的不同宗（race）传播同种病毒不同株系的能力可能有差异。可能有下列几种类型的差异：

（1）成功传播的百分率，如蚜虫传播 MDMV 株系的效率（Louie and Knoke，1975）。

（2）介体获毒的最短时间，如 MDMV 在蚜虫介体中的情况（Thongmeearkom *et al.*，1976）。

（3）潜育期的长短，如 PEMV 的株系在蚜虫介体中的情况（Bath and Tsai，1969）。

（4）介体保持侵染性的时间（Thongmeearkom *et al.*，1976）。

（5）有些株系可能根本不能由特定介体传播，如有些 PYDV 的株系和叶蝉种类的关系（Black，1941）。

根据三种蚜虫对病毒的传播能力，在北美存在的大量 BYDV 的田间变株可以分到 5 个主要组群中（Rochow，1979），现在已被承认为不同的病毒种。相当稳定的分组促进了对病毒变株在地理上和连续几个季节中的分布研究。

如果某种病毒的一个株系可以通过机械方式传播，其他所有的株系通常也是如此。然而，有些报道显示，根据寄主克隆和病毒株系的不同，机械传播能力会有很大的差异，如 AMV 在苜蓿上的情况（Frosheiser，1969）。有时会产生有缺陷的株系，其 RNA 没有被蛋白质包被或没有完全包被。这样的株系不能被机械传播，除非它们处于可以免受 RNA 酶攻击的保护之下。

4. 交互保护作用

在第 10 章（第Ⅴ节 D）中讨论过交互保护作用的机制。

早期关于病毒株系间相互作用的观察导致了交互保护作用概念的建立。McKinney（1929）证明，如果烟草植株先受一种绿花叶病毒（TMV）的侵染，再用一种黄花叶病毒接种时不会产生更重的症状。

Salaman（1933）发现用 PVX 的弱毒株系接种的烟草对于随后的 PVX 强毒株系的接种有免疫性，即使在 5 天后就接种亦是如此。它们对不相关的病毒——TMV 和 PVY 的侵染没有免疫性。人们很快发现这种被称作交互保护作用（cross-protection）、拮抗作用（antagonism）或干扰作用（interference）的现象在相关的病毒株系中普遍发生。当第一个被接种的株系引起相对轻的系统症状，而第二个株系引起严重症状或局部坏死枯斑的时候更容易证实这种现象。这样的枯斑很容易观察，由此出现了一种定量的估测方法。相关株系之间的干扰也可这样证实，先将两种病毒混合，一起接种到一种能够对一种或两种病毒（或株系）产生特征性枯斑的寄主上。图 10.22 显示了典型的 TMV 株系受另一个株系干扰而形成黄色局部斑。

曾经有一段时间，人们在研究两个病毒分离物是否是相关的株系时非常倚重于交互保护试验，但后来的发展说明结果的解释需要非常谨慎。在一组无疑是相关的株系中，有一些株系可能产生完全的交互保护，而另外一些组合中可能只是有部分保护作用。曼陀罗属（*Datura*）植物中 PVX 株系的情况见图 17.6。

一些病毒的株系看来根本不出现交互保护。因此，BCTV 的任何一个株系都不能保护水繁缕（*Samolus parviflorus*）免受其他株系的侵染（Bennett，1955）。

就像 TSV 的株系在烟草中的情况一样（Fulton，1978），明确相关株系的一系列分离物间存在着各种可能性：程度不等的相互的交互保护，单向的交互保护，以及没有交互保护。其他可能使交互保护作用测试模糊不清的因素是某些不相关的病毒间可能有相当强烈的干扰作用（Bos，1970）。

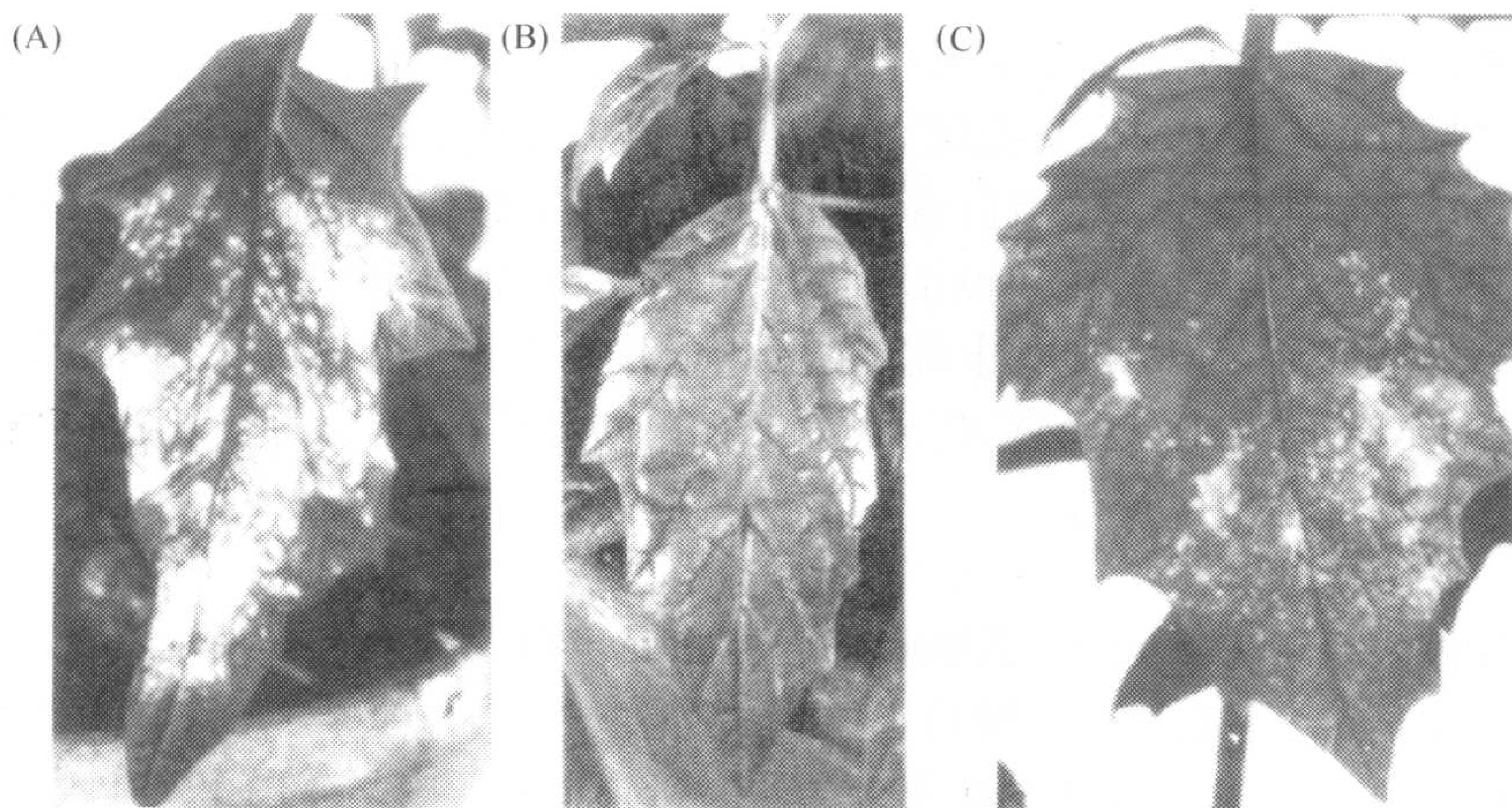


图 17.6 PVX 株系在曼陀罗上的交互保护作用。(A) 健康叶片接种一个产生坏死性局部斑的株系；(B) 以前受该病毒的弱毒株系系统侵染的叶片，表示对接种坏死株系产生了完全保护作用；(C) 以前受一个斑驳株系系统侵染的叶片，表示有部分保护作用。经允许，引自 Matthews (1949b)。

大部分交互保护实验是用机械传播的方式进行的。在受由昆虫介体以持久性方式传播的病毒侵染的植物中也可发生交互保护。因此，Harrison（1958）发现，受 PLRV 弱毒株系侵染的植株可以免受桃蚜（*Myzus persicae*）传播的强毒株系的侵染。类病毒中也有交互保护现象（参见第 14 章第 Ⅰ 节 D.7）。

5. 生产率（productivity）

在标准情况下，一种病毒的不同株系在给定的寄主中产生的病毒数量差异很大。例如，TMV 普通株系生产率最高。如果用一个单斑的抽提液作为接种物接种到普通烟品种珊西 nc（*N. tabacum* cv. Xanthi-nc）上产生的枯斑数目来计算生产率，其他自然发生的株系的生产率在一定范围内下降，最低约为普通株系的 1/10（Veldee and Fraenkel-Conrat，1962）。

化学方法诱导产生的突变体的生产率变化也很大，但都比 TMV 普通株系的生产率低。其中有些株系在某些寄主上引起严重症状，但病害的严重度和生产率之间没有相关性。生产率是一个遗传稳定的特征，因为对于一个特定突变体而言，即使它被连续转接几代，生产率仍然保持恒定。化学突变经常增加病害的严重度，但即使有，也很少能提高生产率。B. Kassanis（Matthews，1991）从 TMV 的一个模式培养物（type culture）中分离到一个能在白肋烟（white burley tobacco）上引起缓慢扩展的亮黄色局部斑的株系，一般不系统扩展（图 10.22）。这些黄色枯斑中的病毒浓度非常低。这样的株系在实验室中很难保存，在自然界中根本无法生存。

6. 比侵染性（specific infectivity）

Bawden 和 Pirie（1956）证明单位重量的提纯的典型 TMV 在心叶烟（*N.*

glutinosa）上的侵染力比曼陀罗株系（datura strain）的大许多。有些证据表明至少在不同的病毒之间，一种病毒的蛋白衣壳与比侵染性的差异有关。因此，Fraenkel-Conrat和Singer（1957）发现RMV的比侵染性只有TMV普通株系的5%；然而，当RMV RNA与TMV普通株系的衣壳蛋白重建到一起的时候，比侵染性比提供RNA的RMV制剂高4倍。重建的（reconstituted）TMV的比侵染性通常比完整病毒低一些。当RMV RNA被包被到TMV典型株系的衣壳内时侵染性提高，其原因还不清楚，可能是因为完整RMV与重建到TMV典型株系衣壳内的RMV RNA更容易在体内脱壳。

7. 基因组亲和性

用多分体基因组病毒不同分离物间各组分的混合物进行生存力（viability）试验的可能性为研究亲缘关系提供了一种功能性的生物学方法。Sanger（1969）用TRV的株系进行过这样的试验。他测试的20个组合（combination）中只有两个产生有功能的互作。线虫传多面体病毒属（*Nepovirus*）的成员在遗传重配试验中表现出了不同程度的亲和性（Randles *et al.*，1977）。

Rao和Francki（1981）发现CMV 3个株系的RNA 1、RNA 2和RNA 3在所有的组合中都是可以相互交换的。然而，就黄瓜花叶病毒属（*Cucumovirus*）的另外一种病毒——TAV而言，只有RNA 3能与这些CMV株系交换。与此类似的是，雀麦花叶病毒属（*Bromovirus*）的两个成员——BMV和CCMV之间也只有RNA 3可以成功地交换（Allison *et al.*，1988）。这些病毒中RNA 1和RNA 2的不亲和性（incompatibility）可能是由于它们基因产物的互作方式导致的（参见第8章第Ⅳ节B. 2）。

当基因产物可以分离到而且其功能已知时，基因组的亲合性可以用更为直接的方式来验证。例如，Goldbach和Krijt（1982）证明CPMV编码的蛋白酶不能切割其他豇豆花叶病毒属病毒（comoviruses）的初级翻译产物。在两种弹状病毒（rhabdoviruses）（LNYV和BNYV）的粒子中存在的转录酶活性不能对异源病毒进行转录（Toriyama and Peters，1981）。

8. 卫星的激活

特定TNV的分离物支持TNV的一些卫星病毒（STNV）的复制，但不支持其他卫星的复制（Uyemoto and Gilmer，1972）。类似的情况是，在黄瓜花叶病毒属病毒（cucumoviruses）和与它们相关联的小卫星RNA中，有些病毒支持特定卫星的复制，而其他病毒不支持（参见第14章第Ⅱ节）。

D. 讨论

在考虑应用各种可能的标准界定病毒株系时，我们应该记住，从严格的遗传学观点来看，核苷酸全序列足以建立病毒间的亲缘关系。但是，核苷酸序列的微小改变就可能有非常不同的表型效果。一个极端的例子是，CP基因上一个碱基的改变使以前观察到的几个表型特性都发生了变化。另一方面，几个碱基的变化可能不引起任何表型上的改变。从实用的观点来看，像寄主范围、病害症状和昆虫介体等表型特征在进行病毒株系的界定和分组时都应占一定的权重。在界定病毒株系时的另一个考虑是如何把它们同病

毒分离物区分开。一个常见的错误是把不同的病毒分离物命名为不同的株系，而它们之间又没有真正的差异。这将在第Ⅲ节中进一步讨论。

第Ⅲ节 株系的分离

能使一个新的株系同其他已知病毒株系区分开的几乎总是生物学特性——通常是在某种特定寄主上病害症状的差异。可以通过数种方式获得新的株系。如果病毒能够机械传播，只要有合适的寄主，通常可以将新的分离物进行几次连续的单斑分离培养。这样做是为了尽可能地保证只有一个单一的株系，保证在这个培养物中没有不相关的污染病毒。有令人信服的证据表明一个病毒粒体或侵染单位就能引起一个局部斑（参见第12章第Ⅱ节E）。另一方面，有充足的证据表明新的突变体很快就会出现。

正如第Ⅰ节A中所讨论的，一种病毒培养物实际上是由许多变株组成的，通常只有一种占主导地位。即使在一个局部斑的形成过程中也会出现许多突变体。例如，在TMV U1株系通过单斑转接时就出现了这样的突变体（García-Arenal *et al.*，1984）。本章中介绍的各种化学和物理方法之所以能提供有用的信息就是因为它们不够灵敏，检测不到一个培养物中存在的任何小比例的特定突变体和变株。

A. 特定寄主中自然发生的株系

一种病毒的不同株系在自然界中时常发生，或者发生在特定寄主种类或品种上，或者发生在特定地点。这些株系在温室内合适的寄主植物中可以培养。

B. 从系统感染的植物上分离株系

受一种病毒系统侵染的植物时常会表现出某些组织的非典型区域含有与培养物中主要株系不同的株系。这些组织区域可能是花叶症状图式的不同部位（参见第9章第Ⅳ节D）或者是系统感病的叶片上一个小的坏死斑或黄色斑，如受PVX轻斑驳（mild mottling）株系侵染的烟草植株。当把这样的区域或斑切下来，接种到新鲜寄主植物上时，就可证明它们可能含有明显不同的株系。

有时，通过机械接种或介体传播进行病毒的常规移接（routine passage）也会导致症状的变异。用二点黑尾叶蝉（*Nephotettix virescens*）在水稻上进行RTBV的常规传播时分离到了一些症状变株（Cabauatan *et al.*，1995）。当时分离到了4个症状不同的变株（称为株系），它们的基因组随后经过序列测定，证明发生了各种碱基替代、插入和缺失（Cabauatan *et al.*，1999）。

从系统感染的叶片制备原生质体时，即使这些叶片呈现出表观上一致的症状，也为我们提供了对这些叶片的精确“解析”（dissection）的可能性。通过从这些原生质体再生植株（Shepard，1975）或用来自单个细胞里的病毒接种供试植物（Fraser and Matthews，1979a）都可以从中发现天然的突变体。

C. 通过特定寄主或生长条件选择株系

在某个寄主植物内个别的株系可能比其他株系增殖和移动得快。这样的寄主可以用

来分离株系。同样地，不同的株系可能在特定寄主中某个温度下增殖和移动的速率不同。

Holmes（1934）发现，用 TMV 的强毒株系接种番茄和烟草茎，在 35℃环境中培养，随后植株中出现了在 35℃易于增殖的弱毒株系，而原来的强毒株系在 35℃难以增殖。这一个结果后来又被其他人反复证实过。例如，Lebeurier 和 Hirth（1966）在连续高温条件下通过在烟草上的系列转接（serial passage）分离到了一个能够在 36℃有效增殖的 TMV 株系。

低温处理也已用于分离株系（McGovern and Kuhn，1984）。可以设想，通过特定寄主或生长条件进行株系筛选可能会筛选到一个细胞间移动蛋白比原先的优势株系更适合该寄主或条件的株系。在毛叶（野生）烟（*Nicotiana sylvestris*）上能引起过敏性反应的 TMV U1 培养物中存在着一个小的病毒亚种群（subpopulation），该亚种群能迅速向植株上部移动，是在苗轴（shoot axis）快速生长的抽薹（bolting）期从植株的上部选出来的（Khan and Jones，1989）。

基于基因沉默的寄主防卫体系新概念和病毒抑制这一防卫体系的能力差异提出了抑制能力不同的株系这一问题（参见第 10 章第Ⅳ节）。目前对这些问题还没有加以考虑。

D. 通过介体分离株系

介体可以通过 3 种方式用于分离株系：①让介体在发病植物上取食较短的时间，可能病毒混合物中只有一个株系能由介体传播。叶蝉取食 15 min 就可传播 BCTV（Thomas，1970）。②特定的介体可能优先传播一种病毒的某些株系（参见第 11 章第Ⅲ节 E. 4）。③ 用稀释的接种物饲喂昆虫介体，然后从发病植株中重复筛选特定的症状类型可以分离到一种病毒变株（Kimura *et al.*，1987）。

E. 人工诱导突变体的分离

实验诱导的突变体在植物病毒学中已经用于两种类型的重要研究。亚硝酸诱导的 TMV 外壳蛋白基因的突变在研究遗传密码的本质和证实突变的本质上曾发挥了重要作用。亚硝酸也曾用于诱导温敏（temperature-sensitive，*ts*）突变株，主要针对 TMV，以帮助界定病毒基因组在体内的功能。亚硝酸诱导的突变体曾被用作弱毒株系资源以便通过交互保护防治病害。

自发的背景突变导致了在第Ⅰ节 A 中介绍过的准种的形成，但在受侵染的叶片中许多天然突变株都被优势株系或主序列（master sequence）抑制了。像 HNO_2 这样的诱变剂能钝化大多数受处理的病毒 。因此，要证明一种诱变剂是增加了突变率而不是选择了一个次要序列（minor sequence），应该分别将经过处理和未经处理的病毒稀释很多倍，使处理的和作为对照的样品产生同样数量的侵染（Melchers，1968）。

1. TMV 的外壳蛋白和其他突变体

要分离突变体，可利用分别含有 *N* 基因或 *N′*基因的不同寄主的反应。一个简便的分离突变体的方法是，在大多数枯斑是由单个病毒粒体侵染引起的条件下，接种可产生

坏死性局部斑的寄主。有时突变体产生易于识别的、不同的坏死性局部斑，一般比正常的斑小（Siegel，1960）。若要发现其他的症状差异，可把一个枯斑剪下来，接种到可产生系统症状的寄主上。根据寄主上产生的不同症状就可识别出突变体。

另一个分离突变体和估测其发生频率的方法是使用在一种寄主上产生系统症状、而不产生坏死性或其他明显的局部斑的病毒亲代株系（parental strain）。然后寻找在这个寄主上产生坏死性、黄色或其他典型性局部斑的突变体。该方法可以选择一类突变体，但有时难以从培养物中除去亲代病毒，即使通过连续的单斑分离也难以成功（图10.22）。

分离突变体的第三个方法是将接种物稀释到只有一半（或更少）的接种植株发病。使用产生系统症状的寄主。在这样的条件下，可以认为大部分染病的植株只受到一个病毒粒体侵染，而对于多分体病毒而言，是只受到了一个侵染单位（infection unit）的侵染。

2. 温度敏感（*ts*）型突变体

用亚硝酸处理病毒分离 *ts* 突变体的目的是在非许可温度（non-permissive temperature）下获得一系列某种功能缺损的独立的病毒突变体。用于筛选这样一些突变体的方法不能排斥任何特定的顺反子中发生变异的突变体。

早期的方法筛选到了发生氨基酸替代的 *ts* 突变体，其衣壳蛋白在非许可温度下有缺陷（Jockusch，1964；Wittmann and Wittmann-Liebold，1966）。

Dawson 和 Jones（1976）基于所有的 *ts* 突变体在非许可温度（32℃）下侵染和起始复制都比较慢这一想法建立了一种选择 TMV *ts* 突变体的方法。TMV U1 在 32℃下可以在珊西烟（Xanthi-nc）叶片内复制，但不产生坏死斑。一旦温度降回到 25℃，坏死斑会迅速出现。如果是由一个 *ts* 突变体导致的侵染，则温度降回到 25℃时坏死的发展会显著延迟。Dawson 和 Jones 使用这一方法，筛选了大约 50 000 个经亚硝酸处理的 TMV 侵染形成的病斑（lesion），他们最后获得了 25 个 *ts* 突变体。这些突变体中的大多数恢复到野生型的概率非常小，因而可以用它们在 25℃下进行生物化学研究（Jones and Dawson，1978）。

为了获得突变位于长杆粒体中的 RNA 中而非衣壳蛋白基因所在的短杆粒体 RNA 上的二分体病毒 TRV 的 *ts* 突变体，Robinson（1973）在亚硝酸处理过的病毒中加入了过量未经处理的短杆粒体。将该混合物在 20℃下接种到一种局部斑（local lesion）寄主上。分离单斑（single lesion）后，分别在 20℃和 30℃接种到局部斑寄主上进行突变体的初步筛选。

F. 通过分子克隆分离株系

对于许多病毒而言，已经克隆了 DNA 病毒的有侵染性的基因组和 RNA 病毒的 cDNA。克隆的过程意味着准种种群里的单个基因组分子被分离出来，由该种群的一个组分引起侵染。这是分离株系的终极方法。其中一个例子就是从受 MSV 尼日利亚株系（MSV-N）侵染的植株中分离 MSV 的两个不同的症状变株（Boulton *et al.*，1991a）。用土壤杆菌接种法（agro-inoculation）使一个变株（MSV- Nm）侵染玉米后，产生狭

窄、轻度褪绿的不连续的线纹（条斑）（discontinuous streak)，另一个变株（MSV-Ns）则导致产生较宽的、严重褪绿的线纹。这些变株的一些分子特征已在第10章（第Ⅲ节O.1.d）中介绍过。

第Ⅳ节　变异的分子基础

A. 突变（核苷酸变化）

1. 化学诱变剂

单个核苷酸的突变包括一个碱基在某个位点被另外一个碱基替换，或一个核苷酸的缺失或附加。在编码区发生的单个碱基的变化可能会导致：①蛋白质产物中一个氨基酸被另外一个所替代；②引入一个终止密码子，使翻译提前终止，从而得到一个较短的多肽；③在特定寄主上一个密码子被一个更常用或不常用的密码子所替代。编码区一个核苷酸的缺失或附加将引起移码，导致缺失或附加位点下游氨基酸的全部改变。这样的缺失或附加通常是致死性的，除非由第二个变化（附加或缺失）所补偿而恢复原来的可读框。非编码区核苷酸变化引起的影响会因为该序列的调节和或识别功能而不同。

引起突变的一些处理措施也会钝化病毒。关于钝化和通常产生褪绿斑的培养物产生坏死性局部斑症状的定量研究与基于一个化学事件可以造成钝化、一个事件可以造成突变的假设得到的理论曲线非常吻合。

Gierer 和 Mundry（1958）首次证明了亚硝酸是 TMV 的高效体外诱变剂。其诱变作用据认为是通过胞嘧啶经脱氨作用（deamination）变成尿嘧啶和腺嘌呤经脱氨作用变成次黄嘌呤（hypoxanthine）来实现的。在经处理的 RNA 进行复制时，次黄嘌呤的行为像鸟嘌呤，即与胞嘧啶进行碱基配对。在下一轮复制事件中，该位置的碱基与一个鸟嘌呤配对，这样在原来的位置上一个腺嘌呤被一个鸟嘌呤所代替。在亚硝酸诱导的 TMV 突变体外壳蛋白中发现的氨基酸替换证实了这些脱氨作用是诱导突变的基础。对 TMV 突变体的这类研究对我们理解遗传密码做出了重要的贡献。它们证实密码是非重叠、简并性的，有力地支持了遗传密码的通用性这一观点（Wittmann and Wittmann-Liebold，1966；Sarkar，1986）。亚硝酸引起的单碱基改变后来也被氨基酸和核苷酸序列数据所充分证实（Rees and Short，1982；Knorr and Dawson，1988）。

5-氟尿嘧啶（5-fluorouraci）是尿嘧啶的一个（结构）类似物（analogue），如果将其提供给植物则会整合到在植物体内复制的病毒 RNA 中。它可取代 RNA 中的尿嘧啶残基，导致尿嘧啶→胞嘧啶和腺嘌呤→鸟嘌呤的变化（Wittmann and Wittmann-Leibold，1966）。其他一些化学品对 RNA 病毒有不太明确的诱变效果。对于试验性的突变诱导而言，亚硝酸通常是最有用的诱变剂。

2. X 射线辐射和紫外线辐射

电离辐射（ionizing radiation）和紫外辐射能钝化包含 dsDNA 的病毒，这些因子也能引起这类病毒以及 ssRNA 病毒的突变。例如，纯化的 AMV Tb 组分经过紫外线照射后产生了 AMV 的温度敏感型突变体（van Vloten-Doting *et al.*，1980）。

3. 提高温度

一些研究人员注意到，如果植株在较高的温度下生长，分离到的变株株系（variant strain）数量会增加（Mundry，1957）。然而，也有证据表明，一定的温度对特定株系的增殖和侵入非常有利。热处理的一个主要效果可能就是对准种种群（quasispecies population）里某种类型的自发突变体（spontaneous mutant）或次要成员有利。

4. 自然突变

毫无疑问，在体内自然条件（natural conditions *in vivo*）下，一个碱基的改变产生蛋白质中一个氨基酸的改变是病毒变异的主要来源。因此，在 Wittmann 和 Wittmann-Liebold（1966）列出的 TMV 的 16 个自发突变体中，6 个突变体在衣壳蛋白中有一个氨基酸的改变，一个有两个氨基酸的改变，一个有 3 个氨基酸的改变。其中许多衣壳蛋白中氨基酸的替换与亚硝酸诱导的碱基改变不一样。8 个突变体有正常的衣壳蛋白，因此必定在衣壳蛋白的顺反子（cistron）之外的 RNA 上有一个或多个碱基的改变。两个自然发生的 AMV 株系衣壳蛋白上的 15 个氨基酸替代的大部分都可用单一的点突变来解释（Castel *et al.*，1979）。可以推测，这些突变体的大多数是由于病毒 RNA 复制过程中依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶的拷贝错误造成的。自然发生的类病毒（viroid）的序列变株中的差异主要由一系列碱基替代组成（Visvader and Symons，1985），尽管也有核苷酸的附加和缺失发生。在第 8 章第Ⅸ节 A 中已详细地讨论过自然突变。

B. 重组

许多年以来，人们一直认为重组是几乎完全限于以 DNA 为遗传物质的生物体的遗传机制。现在知道重组在基因组为 DNA 或 RNA 的植物病毒中都会发生。在第 8 章第Ⅸ节 B 部分已经详细地讨论了 DNA 和 RNA 病毒的重组。

C. 缺失和附加

重组事件能导致 DNA 和 RNA 病毒的基因组的缺失。这时常引起第 8 章（第Ⅸ节 C）中讨论过的缺陷性或缺损干扰（defective interfering）核酸的产生。

在文献中，有许多关于通过重组 DNA 质粒的体外修饰产生的附加的碱基序列的突变体病毒的报道。自然发生的这类附加的现象不太常见。在一组自然发生的变株中，有时难以确定长度的差异是否产生于碱基的附加或缺失。Kimura 等（1987）在用稀释的原种培养物（株系 0）作接种体注射叶蝉接种 RDV 后，反复选择症状严重的水稻植株，结果分离到了一个强株系（S）。株系 S 的 RNA4 比株系 0 的相对分子质量约大20 kDa。株系 0 的 43 kDa 蛋白质相对应的株系 S 的蛋白质分子质量为 44 kDa；现在还没有证明 S 是否由 0 经过一些核苷酸的附加而衍生出来的。株系 0 也可能是由 S 通过缺失事件产生的，亲代株系在培养中只维持在一个低水平的状态。分段在雀麦花叶病毒属病毒（bromoviruses）中，CCMV RNA 3 的 5′非编码序列含有一个 BMV 中不存在的 111 个碱基的插入，可能是这两种病毒中有一个发生了序列重排（rearrangement）（Allison *et al.*，1989）。

有些 RNA 病毒中存在着大段序列的重复。例如，AMV 的 S 株系和 L 株系的 RNA 3 的前导序列中分别有 56 nt 和 75 nt 的序列重复（Langereis *et al.*，1986b）。这些重复在前导序列中串联在一起，看来并非是复制所必需的。Langereis 等认为，这些重复可能是聚合酶分子过早地从 RNA 3 的负链模板上释放下来，又在新生链（nascent strand）仍附着在上面时在同一模板上重新起始形成的。

D. 核苷酸序列重排

一个关于核苷酸重排的例子是 TRSV 的卫星 RNA（STRSV）(Buzayan *et al.*，1987)。TRSV 的 62L 株系和 NC-87 株系的 STRSV RNA 都有 360 个残基的序列。有 359 个残基、可导致芽枯病（bud blight）的卫星 RNA 和这些有 360 个残基的 RNA 的区别主要在第 100～140 个核苷酸之间的区域。这一区域序列的不同与图 17.7 所示的多个区域的核苷酸残基的重排是一致的。

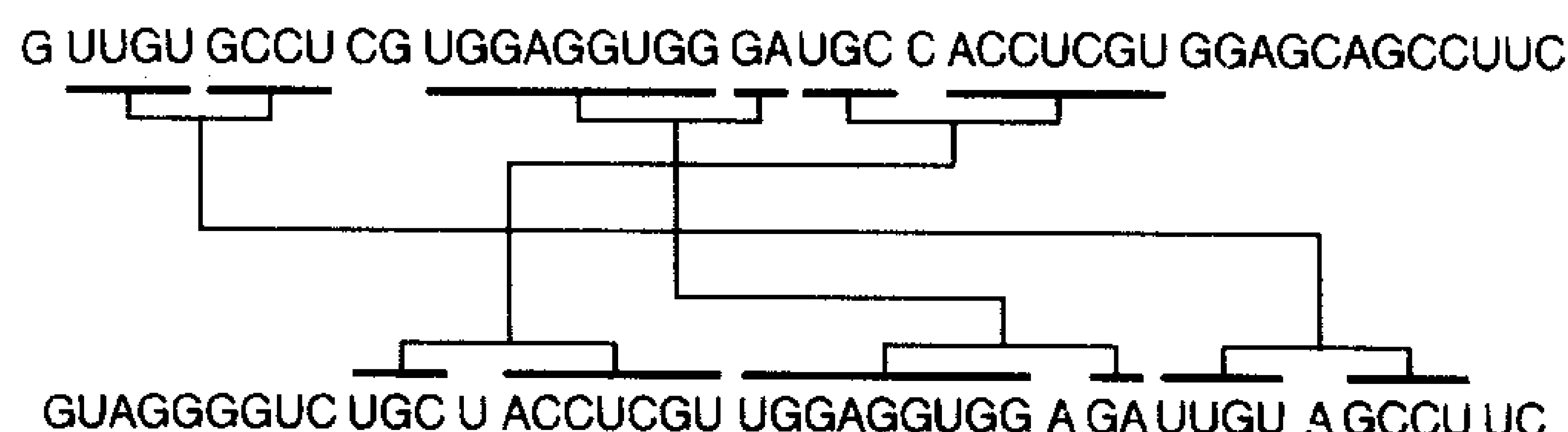


图 17.7 TRSV 的两个卫星 RNA 间可能发生的核苷酸序列重排。上行，株系 62L，第 100～145 个核苷酸。下行，芽枯株系，第 100～143 个核苷酸。粗线指可能已发生重排的序列。连接线指示两个株系间的相同序列。承蒙 G. Bruening 惠允，引自 Matthews（1991）。

E. 多分体基因组的重配（reassortment）

自从 TRV 株系的长粒子和短粒子的经典实验（Lister，1966，1968；Frost *et al.*，1967）以来，已经对绝大多数已知的多分体病毒进行了遗传重配实验。这些实验无可争议地证明，已有的病毒基因组片段在实验室内和自然界中经过重配都可以产生新的变株（Fulton，1980）。

成功的重配并不总是双向（相互）有效的。例如，Rao 和 Hiruki（1987）用 RCNMV 的两个株系发现，株系 TpM34 的 RNA 1 和株系 TpM48 的 RNA 2 的混合物是有侵染性的，而株系 TpM34 的 RNA 2 和株系 TpM48 的 RNA 1 的混合物则没有侵染性。

虽然 BMV 和 CCMV 已经被视为两种明确不同的雀麦花叶病毒属病毒（bromoviruses），在某些组合中它们单个的 RNA 组分能彼此互补（Allison *et al.*，1988）。从每个病毒的基因组 RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的完整 cDNA 拷贝已通过转录获得了加帽的体外转录物。RNA 1 和 RNA 2 编码的蛋白质参与 RNA 的复制，但它们的任何（不同病毒种间的）异源组合（heterologous combination）均不能复制（参见第Ⅱ节 C.7）。相反，在两种组合中含异源 RNA 3 的病毒都有生存力，能在原生质体中复制，在藜属（*Chenopodium*）植物上引起局部斑。然而，没有哪一种杂合体病毒能系统侵染天然的亲代寄主植物。

F. 自然界中株系的起源

上面提及的所有类型的分子变化都会促进自然界中株系的进化。或许造成蛋白质中一个氨基酸改变的单个碱基的变化是产生自然变异的最常见的事件之一。自然发生的一些 TMV 株系的衣壳蛋白的一级结构支持这一观点（Wittmann and Wittmann-Liebold，1966）。

各种病毒产生新株系的速率看来差异很大。已知 TMV 有大量的株系，但 TBSV 只有几个株系。一种病毒的不同株系产生一个特定症状类型的突变体的速率差别也非常大。因此，PVX 的一些在烟草上引起褪绿斑的株系经常突变产生环斑株系，而其他的株系根本不产生这样的突变（Matthews，1949a）。在豇豆上形成白色斑（white lesion）的 TNV 株系时常产生引起红色斑（red lesion）的株系（Fulton，1952）。这些红色斑总是在最初看起来像斑点（spot），与白色斑相连的区域（sector）类似。不同的白色株系产生红色突变体的速率在 5 倍的范围内变化。没有观察到反向过程（红色株系产生白色株系）。株系出现速率的差异不一定与实际突变率的差异直接相关。一些病毒或株系可能产生很高比例的缺陷性或完全没有生存力的突变体。一些明显的不同或许反映出我们检测突变体能力的局限性。我们可以想像，随着各种机制导致的变化在病毒编码的各蛋白质中的积累越来越多，株系离亲代病毒会越来越远。这类株系的存活和传播通常取决于它们在寄主内的竞争优势，它们偶然在该寄主内产生，随后侵染其他的寄主。新株系的生存并不总是依赖于即时的选择优势，尽管持续的生存需要各种特性的适当组合。例如，Reddy 和 Black（1977）指出了 WTV 的缺失变株如何在生长中的的三叶草植株的某些枝内偶然占据了优势。如果缺失事件发生在病毒浓度很低的顶端分生组织附近的一个细胞中，突变体可能会在一个特定的条（shoot）内完全取代亲代病毒。他们指出这一过程可被看作是通过地理隔离而进化的一个缩影（例证），此处植物的不同枝条提供了地理隔离。我们将在第Ⅸ节中进一步讨论病毒株系的进化。

第Ⅴ节　变异的限制

如第 8 章第Ⅸ节 A 中所讨论的，在大多数病毒的基因组中没有复制中的校正机制，这导致了本章前面各部分所介绍的大多数变异。鉴于这类高频率的变异，一定有某些限制因素（constraint）控制着病毒种或株系以保持其同一性（identity）。可能病毒基因组的大多数突变是中性的或有害的。导致一个重要功能损失的突变不会在一个种群中得到增殖，除非该种群的其他成员与其互补。然而，只引起“适合度”（fitness）下降的突变更有可能会被保留下来。

A. 穆氏齿轮

从理论上来讲，高突变率对种群会有显著的影响，尤其是种群较小时。穆氏齿轮（Muller's Ratchet）的概念是，如果一般突变是有害的，将会有一种遗传漂变降低种群的适合度（fitness），导致“突变熔化”（mutational meltdown）（Muller，1964；Lynch，1993）。穆氏齿轮在小群体中特别有效，而且对许多病毒来说，传播和侵染形

成了一个限制小种群的瓶颈（Duarte *et al*. 1993；Bergstrom *et al*.，1999）。在有害突变的特定位点发生的回复突变（back mutation）或互补突变（compensatory mutation）发生的比率比正向突变（forward mutation）比率低（Haigh，1978；Maynard Smith，1978）。在高等生物的群体中，该遗传漂变受到有性生殖的限制。有性生殖通过基因交换产生了很少有或没有突变的基因组。很明显，在常规意义上病毒没有这一过程，但是准种内的重组或遗传重排可能在控制穆氏齿轮的影响方面有一定的作用（Chao，1997）。

B. 穆氏齿轮对植物病毒有作用吗？

在一项对过去100年间在澳大利亚侵染光叶烟（*Nicotiana glauca*）的烟草花叶病毒属病毒的研究中，Fraile等（1997a）发现了一个可以用穆氏齿轮来解释的例子。他们分析了1899～1993年新南威尔士植物标本室（herbarium）干燥的光叶烟标本和活的光叶烟样品中的烟草花叶病毒属病毒。在1950年之前，许多植物同时受TMV和TMGMV的侵染，自此之后，只能发现TMGMV。在对光叶烟的共同侵染试验中，TMV积累到单独接种时水平的10%左右；而TMGMV的水平不受影响。Fraile等（1997 a）得出结论，认为TMV在新南威尔士州寄生光叶烟早于或快于TMGMV，但后者使TMV种群下降到能消除有害突变的阈值以下。

然而，TRV的线虫传播是一个瓶颈，它能将病毒种群中的缺损干扰RNA（DI RNA）清除出去（Visser *et al*.，1999）。这些DI RNA来自于TRV PpK20分离物的RNA 2（图6.38），其衣壳蛋白基因有所改变，并能干扰病毒的复制。一般认为，TRV RNA 2和DI RNA分别包被在各自编码的衣壳蛋白内，TRV RNA 2的衣壳蛋白在传播中是有功能的，而DI RNA的衣壳蛋白在传播中没有功能，这样在传播这一瓶颈处DI RNA受到清除。这一点与马铃薯Y病毒属病毒和黄症病毒属病毒基因组的异源包裹（heterologous encapsidation）（参见第8章第X节A）不同，后者使有介体传播缺陷的分离物成为可传播的。

同样地，蚜虫传播也时常能将CTV分离物中的基因组RNA变株与缺损的D-RNA种群分开（Albiach-Marti *et al*.，2000b）。

第Ⅵ节　植株中的病毒株系

在前面几节中，我们介绍了分离病毒株系的方式、产生株系的分子机制以及区分株系所用的标准。这里讨论一些株系在受侵染植物中的某些活动（性）。

A. 交互保护

一般认为某种病毒的一个株系防止另一个株系侵染的、对植物的保护作用依赖于保护性病毒（protecting virus）在受保护组织（protected tissue）内的存在。这在第Ⅱ节C.4中详细讨论过。如果由于某种原因，一株植物或一株植物的某个部分失去起保护作用的病毒，则它对第一个株系或其他株系的再侵染（reinfection）通常是感病的（susceptible）。寄主一般性防卫系统的反应系统蔓延时可能会出现例外的情况（参见第10

章第Ⅳ节 E)。

B. 特定寄主内的选择性存活

若将在一种寄主内保持在非常稳定的状态的一个病毒培养物转移到另一种寄主上，然后再接种到原来的寄主上时，有时会发现培养物中的优势株系已经改变了。Carsner (1925) 证明 BCTV 的一个培养物传播到墙藜 (*Chenopodium murale*) 上后可发生改变。当将该病毒从这种植物回接到甜菜上的时候，它只产生了轻度的症状。Lackey (1932) 发现这种变化是可逆的，如果将病毒转接繁缕 (*Stellaria media*) 后，则该病毒就其在甜菜上产生的症状而言可回复到原来的状态。根据 Salaman (1938) 的结果，当将 PVX 的一个引起环斑症状的株系接种到甜菜幼苗时，只产生小的坏死环 (necrotic ring)。当将局部斑中的病毒回接到烟草的时候，只产生轻微的斑驳症状。Matthews (1949c) 曾描述了一种与此相反的情况。将在烟草上产生轻斑驳的 PVX 转接到树番茄 (*Cyphomandra betacea*) 上，然后再回接到烟草上，结果只产生局部和系统的环斑症状。树番茄是试验用的 19 种茄科植物中唯一可引起这种变化的植物。试验中用到的弱毒分离物含有少量可能通过突变产生的环斑株系。有人认为这些环斑株系在树番茄中比弱毒株系增殖得更快，因而它们在这种寄主中占优势。环斑株系单独侵染树番茄时的病毒浓度是其在烟草中浓度的数倍。弱毒株系在烟草中的浓度是环斑株系在该寄主中浓度的 4～8 倍。这是寄主选择准种群体中不同优势成员的一个例子。

Johnson (1947) 发现普通的强毒型 TMV 转接水生刺芹 (*Eryngium aquaticum*) 后在烟草上只能引起轻度的症状。他证明强毒株系在水生刺芹中移动得较慢，这就可以解释这一寄主的“过滤”作用。

不能系统侵染豇豆品种 Blackeye 的一个 CMV 分离物接种到品种 Catjang 上出现了一些特别大的局部斑。这些大的局部斑接种到豇豆品种 Blackeye 上产生了系统坏死症状 (Lakshman *et al.*, 1985)。

这些不同的选择现象可能是病毒株系所编码的细胞间移动蛋白的差异所造成的，或者是病毒与寄主防卫系统互作的结果。例如，上述烟草中 PVX 的弱毒培养物可能不断地产生一些在烟草中不能与亲代株系竞争的细胞间移动蛋白突变体。然而，有些突变体的移动蛋白可能比亲代株系更加适应在树番茄中的系统移动。回复突变率一定很低，因为在树番茄中筛选到的株系在烟草上培养时也非常稳定。既然已经知道基因组 RNA 的核苷酸序列，就可以研究特定寄主对株系的选择是否涉及移动蛋白的突变。像伴随 CMV 的卫星 (如 CARNA5) 这样的卫星 RNA 在特定寄主内可能发生差别复制 (differential replication)。这可能为在特定植物内病毒分离物症状的变异提供了另外一个基础 (Waterworth *et al.*, 1978)。例如，CARNA5 以一系列密切相关的序列形式存在 (Richards *et al.*, 1978)，可以对条件的改变作出迅速反应，以便进行复制。

C. 转接另外一个寄主后失去对一种寄主的侵染性

如果连续地在另外一种寄主上转接，就可能失去在一种寄主上的侵染性。例如，PVX 的几个株系连续在烟草上增殖后失去了对马铃薯的侵染性 (Matthews, 1949a)。在 AP 株系失去对马铃薯的侵染性这一段时间内未观察到烟草、心叶烟 (*N. glutinosa*)

或曼陀罗（*Datura tatula*）上症状的改变。变化的本质还不清楚，但是它可能反映了对更能适应烟草上生长的株系的筛选。也可能是，在马铃薯上该准种的一个次要成员（序列）只能通过主序列或其他主要序列的互补作用才能在该寄主内增殖。经过转接到另外一种寄主后立即失去对一种寄主的侵染性可能是由于只在某些寄主内起作用的病毒抑制剂（virus inhibitor），而不是由于病毒本身发生的任何改变。

D. 体内双重侵染

表型混杂（参见第 8 章第Ⅹ节）的存在说明两个病毒株系可以在同一细胞内一起复制。下列证据证实了这一观点：

（1）许多观察结果证明一种病毒的两个株系可以在完整植株的同一细胞内存在。因此，Hull 和 Plaskitt（1970）在同一细胞内观察到了 AMV 的两种分离物粒子的特征性聚集物。

（2）当将 TMV 的 *ts* 突变体——Ni118 与普通 TMV 的混合物同时接种烟草并在 35℃条件下培养，有些突变体 RNA 包装到普通株系的衣壳蛋白内（Takebe，1977）。

（3）TMV 接种的原生质体对紫外线钝化表现出多靶标反应（multitarget response）（Takebe，1977），表明在一个细胞内有不止一个粒子可以起始侵染。

因此，尽管缺乏直接证据，现有的证据表明两个株系可以在完整植株的同一个细胞内同时侵染和复制。一个主序列和许多次要序列的准种概念（参见第Ⅰ节 A）说明这是一种不寻常的情形。然而，有些时候可能要有两个或多个主序列以反映两个株系共侵染（coinfection）的情形。

E. 在不同环境条件下的选择性增殖

温度可能是影响自然发生株系的存活（survival）或超优势度（predominance）的最为普通的环境因素。第Ⅲ节（C 和 E. 2）中已述及如何在实验中利用温度来分离株系。在世界上气候炎热的地区，在这样的温度下生存的病毒株系是自然选择的结果。通过对人工诱导的 *ts* 突变体的研究结果可以使我们理解温度对自然发生株系的影响的基础（参见第Ⅲ节 E. 2）。

第Ⅶ节　鉴定病毒和病毒株系的标准之间的相关性

在前面几节中，我们分析了可以用于界定病毒分离物之间变异的各种标准。我们如何使用这些标准以决定一个特定的分离物是否与另外一个相同？或是一个相关的变株或株系？或者是一种不同的病毒？这是一个有相当实际重要性的问题，因为病毒株系的识别和鉴定对于病毒的有效控制可能非常重要。此外，病毒学文献中充斥着对病毒分离物的不适当的描述。它们经常被描述为新病毒或新株系，尤其是在一种新的寄主上或另一个国家发现时，深入的研究可能会证明它们与已经报道的某些病毒是相同的。第 2 章第Ⅰ节 C 部分给出了病毒种的定义。

A. 同一性的标准

要证明两个病毒分离物是否相同只有一个标准，即基因组核酸碱基全序列的同一性。尽管近年来核酸测序（sequencing）技术发展很快，但若期望它成为常规方法通常是不切实际的。出于最实用的目的，下列各项标准足以暂时确定两个病毒分离物的同一性：①大小、形态，以及电子显微镜所显示的病毒粒体的任何超微结构；②在适当的测试中表现出血清学上的同一性；③对一组鉴别寄主和基因型表现出相同的症状和寄主范围；④相同的传播方式，尤其是涉及节肢动物、线虫或真菌介体的时候。某些方面核酸序列的信息会强化关于同一性的推测，如基因组某一区域的相同序列或通过异质性作图（heterogeneity mapping）确定的同一性。

B. 株系和病毒

在第 2 章中介绍过病毒分类的宽泛问题。在这里我们将考虑应用本章前面内容中列出的各种特性来限定病毒株系、将其归类以及确定一个分离物是一个株系或一种不同的病毒时所遇到的各种问题。

一个方法是定量测定一系列特性，如衣壳蛋白的氨基酸组成等。然后应用统计学方法和计算机分析根据计算出的相关程度来加以分类。计算机分析在处理大量的数字数据（numerical data）时特别有用，如从氨基酸序列得到图 2.3；然而，基于计算机分析的分类并不比其他分类方法更客观。它依赖于个人判断和提供数据的分类学家所做的选择。

在 Adansonian 方法中，归类时所有的已知特性都给予一定的权重。这一方法随着计算机的普及越来越受欢迎，但也有其显著的局限性。例如，就像前面提及的，一个小病毒的许多相当容易测定的特征都取决于衣壳蛋白的性质。因此，衣壳蛋白的差异可能被给予了不适当的权重。同样地，可能只是因为记录到扩展的寄主范围的差异而使两个株系之间的症状差异被强化。

另一方面，等级系统（hierarchical system）中需要人为地确定哪一个特性最为重要。有人强烈反对不加任何改进地运用这样一个系统，尤其是我们考虑一组相关病毒的分类时。不同的病毒组群内最有用的特性应该是不同的。因此，由于 STNV 的衣壳蛋白是该卫星病毒的唯一基因产物，应该比有（比如说）10 个基因的一种病毒的衣壳蛋白有更大的权重。同样地，粒体的形态在弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）那样具有复杂结构的组群可能是非常有用的。

最好的途径或许是将一组变株内所有已知特性都加以考虑，并结合所涉及的组群的整体特性以常识方式确定权重的务实的做法。

当病毒保藏培养物在实验室中与 TMV 和 TYMV 一样出现株系（通常从一个突变产生）时，我们就有理由确信它们与亲代株系密切相关。大多数特性的表现型差异通常很小，但有时像 TMV 的一些株系如 PM1 一样能产生有缺陷的衣壳蛋白，不能产生完整的病毒。

田间采集的病毒分离物（也许是从不同国家的不同种类的寄主上采集的），可能在有些特性上相关，而根据其他特性来看又不相关。目前能得出的、唯一的一般结论是，

密切相关的株系只在少数几个特性上有差异，而亲缘关系远的株系在许多特性上有差异。不同特性表现出的相关性程度在不同的病毒组群间差异很大。

C. 各种标准的相关性

从纯遗传学的观点来看，如果我们知道一系列病毒株系基因组的核苷酸序列的差异，就可以精确地估计它们之间的关系。然而，从病毒学的观点来看，就必须考虑其他因素。例如①沉默的核苷酸改变，即不导致病毒的结构或功能的改变，通常没有意义。然而，我们应该记住，随着知识的积累，现在被认为没有功能的核苷酸将来可能发现是有重要意义的。②特殊的基因功能可能有特殊的生态学方面的实际意义，如影响昆虫介体专化性的病毒基因的突变。③当大量的田间分离物必须在短时间内分开时，只有快速诊断方法才是可行的。特定标准可用的置信度（confidence）部分取决于它们与其他标准的相关程度。本节下面将对这些问题加以简要介绍。

1. 寄主反应

如果一群株系密切相关，寄主反应可能是确立株系类型最好的、甚至是唯一实用的标准。例如，Mosch 等（1973）发现从温室中的番茄上采集的 18 个 TMV 分离物可以根据它们在一系列番茄（*Lycopersicon esculentum*）无性系（clone）上的致病性分为 3 个群。它们在某些物理性质（浮力密度和沉降系数 $S_{20,w}$）上没有差异，在衣壳蛋白组成上只有个别小的差异。这些特性与根据致病性划分的群没有相关性。当一种像 AMV 这样有重要经济意义的病毒变异程度很大时，对大量田间样品的分类通常必须主要依赖于在一系列指示植物上的症状和寄主范围（Crill *et al.*，1971；Hajimorad and Francki，1988）。

2. 介体传播

BYDV 3 个分离物之间血清学关系的密切度和蚜虫介体传播之间有相关性（Aapola and Rochow，1971）。Pead 和 Torrance（1989）发现可以用 MAb 来区分 BYDV 的 3 个主要的介体专化的株系群（现在是种）。另一方面，不能用血清学方法将 PLRV 的一个几乎不能被蚜虫传播的分离物和容易传播的分离物区分开（Tamada *et al.*，1984）。TBRV 的血清学关系和渐狭长针线虫（*Longidorus attenuatus*）的英格兰种群传播 TBRV 不同分离物的能力之间没有相关性（Brown *et al.*，1989）。

3. 多分体基因组

多分体病毒之间彼此成功地互补的能力提供了一个有力的、表明相互关系的功能标准。然而，这一性质与病毒粒体的物理特性或其他特性可能不是密切相关。例如，有些曾被视为 CPMV（Swaans and van Kammen，1973）株系的病毒在混合侵染实验中不能成功地彼此互补（van Kammen，1968）。成功的互补作用不仅发生在已明确的株系之间，也发生在同一组的不同病毒之间。这样的结果使应用互补试验作为亲缘关系的标准变得更加复杂。例如，Bancroft（1972）证明 BMV 和 CCMV 之间可以成功互补。两者都属于雀麦花叶病毒属（*Bromovirus*），但它们的寄主范围几乎完全不同，看来也没有

血清学关系。

目前已知等轴不稳环斑病毒属（*Ilarvirus*）和苜蓿花叶病毒属（*Alfamovirus*）的病毒有三分体的基因组，以及一个单独包裹的衣壳蛋白顺反子。对于这两个属的成员而言，如果3个基因组RNA分子用于侵染，则衣壳蛋白RNA或衣壳蛋白本身，是侵染性所必需的（参见第8章第Ⅳ节G)。有些等轴不稳环斑病毒属病毒（如TSV）的衣壳蛋白或衣壳蛋白RNA，能活化AMV的RNA。反向组合也是有活性的。然而，这两个病毒的3个基因组RNA分子的混合物不能彼此互补（van Vloten-Doting，1975；Gonsalves and Fulton，1977)，而且相对应的RNA片段之间没有序列相似性。

表达TSV衣壳蛋白基因的转基因烟草植株对TSV的侵染有抗性，但对AMV是感病的。它们受AMV RNA 1、RNA 2和RNA 3的感染，说明植株内源产生的TSV衣壳蛋白能活化AMV基因组，尽管它不能使植物抗这种病毒的侵染（van Dun *et al.*，1988 b)。通过加入AMV RNA可以特异性地去除AMV核蛋白中的衣壳蛋白。同样，如果加入游离的病毒RNA，等轴不稳环斑病毒属病毒（ilarviruses）的核蛋白也会失去它们的蛋白质。某些等轴不稳环斑病毒属病毒和AMV之间的这种反应有交互性（reciprocity)（van Vloten-Doting，1975；Gonsalves and Fulton，1977)。这些结果使有些研究人员认为AMV应该归类于等轴不稳环斑病毒属内（参见第2章第Ⅲ节J.3)。

4. 总的核苷酸序列相似性

在应用杂交技术时，有些病毒之间完全检测不到碱基序列同源性，但若根据其他特点，如粒体的形态和血清学，它们肯定是相关的（Zaitlin *et al.*，1977)。另一个极端的情况是，Bol等（1975）描述了4个生物学特性差异明显的AMV株系不能用核酸杂交实验区分开。

Rizzo和Palukaitis（1988）根据血清学和核酸杂交的结果把CMV的株系分为两个亚组。在用核酸杂交检测的39个株系中，30个属于亚组Ⅰ，9个属于亚组Ⅱ。属于这两个亚组的RNA可以重配产生能生存的重组体。有人对两个亚组的代表性分离物的RNA 1和RNA 2进行了序列测定与比较（Rizzo and Palukaitis，1988，1989)，发现了RNA不同区域的序列同源性程度有差异（62%～81%)。两个亚组内的株系不能用常规的核酸杂交技术来区别。然而，Owen和Palukaitis（1988）根据13个CMV株系与两个代表株系杂交的能力用分子异质性作图法（molecular heterogeneity mapping）把它们归到两个组内。分子异质性作图法可以区分两个组内的株系。

5. 3′端非编码核苷酸序列

Frenkel等（1989）利用另外一种方法来区分马铃薯Y病毒属病毒和株系。他们比较了13个马铃薯Y病毒属病毒的3′非编码核苷酸序列，发现在其他方面有明显不同的病毒其3′非编码序列长度亦不同（189～475 nt)。序列相似性的程度为39%～53%；这些数值可以与不相关的马铃薯Y病毒属病毒的3′非翻译区的数值相比较，它们可能都在随机配对（chance matching）的预期范围内。相反地，用其他标准鉴定为相关株系的一系列病毒的3′非翻译区在长度和核苷酸序列同源性上非常相似（83%～99%)。在此基础上，WMV-2和SGMV-N有78%的同源性，因此它们被认为是一种病毒的不同

株系。

6. 血清学关系

血清学方法测定的亲缘关系有时可能与其他特性的相关性很高。然而，我们可以预期它们可能与依赖于衣壳蛋白某些特性的那些标准有一定的相关性。

交互保护试验和血清学关系得到的相关程度之间有一定的相关性（如 PVX 株系，Matthews，1949b；BYDV 分离物，Aapola and Rochow，1971）。另一方面，一组 TNV 分离物的血清学关系和它们支持 3 个不同 STNV 分离物复制的能力之间没有相关性（Kassanis and Phillips，1970），TRSV 的血清学关系和其在烟草上的症状之间也没有相关性（Gooding，1970）。

PVX 各株系的 MAb 与根据寄主品种的反应而划分的不同组的株系之间的血清学反应比较复杂（Torrance *et al.*，1986a）。尽管如此，可以鉴定出能克服抗病性的株系。针对 PLRV 的 10 种 MAb 不能区分在指示植物上引起不同症状的株系（Massalski and Harrison，1987）。

过去，马铃薯 Y 病毒属（*Potyvirus*）的病毒和株系非常难以界定。这不只因为该属病毒种类多，也因为用不同的亲缘关系测试方法会得出不同的结果。Shukla 及其同事的工作为该组病毒分离物的分类打下了坚实的基础。例如，早期的工作表明交互保护作用不能区别那些用另外的方法标准（如血清学）证明是不同病毒的分离物。

Shukla 等（1989 b）用衣壳蛋白 N 端制备的抗体证明在澳大利亚和美国侵染玉米、高粱和甘蔗的马铃薯 Y 病毒属病毒（potyviruses）包括了 4 种不同的病毒。更早的交互保护测试结果与此完全吻合（Shukla and Ward，1989a）。同样地，这些分离物形成的细胞质内含体的种类也支持它们属于 4 种病毒的观点。

然而，这种方法仍然遇到一些困难。有些用其他可靠标准来判断时应属于马铃薯 Y 病毒属关系较远的不同病毒间会出现意想不到的血清学交叉反应。引起这些交叉反应的抗原位点（antigenic site）可能是靠近衣壳蛋白 N 端的几个共有的氨基酸（Shukla and Ward，1989a，b）。

7. 非结构蛋白（non-structural protein）

Yeh 和 Gonsalves（1984）用两种马铃薯 Y 病毒属病毒内含体蛋白的抗血清证明它们是一种病毒的相关株系，而不是两种不同的病毒。Thornbury 和 Pirone（1983）证明两种不同的马铃薯 Y 病毒属病毒的辅助成分（helper component）蛋白质在血清学上有明显差异（serologically distinct）。AMV 编码的 35 kDa 与其他 3 种具有三分体基因组（tripartite genome）的病毒的相应蛋白质（corresponding protein）之间没有血清学关系（van Tol and van Vloten-Doting，1981）。

第Ⅷ节　讨论与总结

变异性的研究是植物病毒学最重要的领域之一。因为不同株系在田间引起病害的严重度不同，而且株系可以突变以克服作物对一种病毒的抗病性，所以从实用的角度出

发，变异性的研究非常重要。它对于我们理解病毒过去如何进化、现在正如何进化也很重要。

分离病毒变株有许多方法，可以从自然界中分离，也可在植株外利用某种形式的诱变或其他操纵来分离。*ts* 类型的突变体对于研究病毒结构和复制等各个方面均特别有用。

因为突变率非常高，即使经过单斑转接以后，植物病毒的所有培养物也很可能是由大量株系的混合物组成的。然而，通常一个主基因组序列在培养物中占优势，许多变株不会被检测到。主序列的选择取决于许多因素，包括寄主的基因型及其生长环境。

病毒种群内产生变异的分子机制与细胞生物体（cellular organism）的变异相似，所不同的是许多植物病毒组群的变异是发生在 RNA 上，而不是 DNA 上。产生变异的分子机制包括突变（涉及单个核苷酸的改变、一个或数个核苷酸的添加或缺失）、重组、核苷酸序列区段（block）的缺失或添加（插入）、核苷酸序列的重排（rearrangement）以及多分体基因组之间的重配（reassortment）等。

有许多结构的、血清学的和生物学的标准可用来界定一组或一个科内的病毒以及病毒株系。具体应用哪一种标准取决于研究的目的。如果我们正在研究一个病毒组或科内的进化关系，或一种病毒内不同变株的进化关系，那么所研究病毒的核苷酸全序列是最为重要的，但通常也需要有关病毒基因组的功能性产物的有关知识。如果已知代表性病毒的核苷酸全序列，那么像各种形式的核酸杂交或 PCR 等其他方法对于研究其他的病毒和株系就非常有用。如果我们对开发可靠而快速地诊断田间病毒和病毒株系的方法感兴趣，那么其他的方法将会是适当的。应用某种形式 ELISA 的斑点印迹血清学分析法是一种重要的测试类型。特异性广的多克隆抗体或特异性强的单克隆抗体都可用于此类试验。像病害症状、寄主范围、传播方式和交互保护等生物学标准对于界定病毒和病毒株系可能是很重要的。

病毒种类明确界定的程度因病毒属和科的不同而有很大差异。在没有研究足够多的株系数量和多样性前就定名病毒种类或病毒组群是有风险的。例如，当我们只知道 7 种芜菁黄花叶病毒属病毒（tymoviruses）时，根据血清学关系和 RNA 碱基组成将其分成了两个亚组（Gibbs，1969；Harrison *et al.*，1971）。从此以后发现有许多其他芜菁黄花叶病毒属病毒具有中间特征（intermediate characteristic）（Koenig and Givord，1974）。对于一些组群而言，如马铃薯 Y 病毒属病毒，已经有“一套共同的相关而稳定的特性”能将病毒株系比较准确地归类为种。

分类时一种病毒的不同特性的相对重要性或权重仍然是一个难以解决的问题。只有当我们详细了解了病毒基因组的结构、它编码的多肽及其功能，以及基因组上任何翻译和非翻译区域的调节和其他功能时才能准确了解各种特性的意义。即便有了这样详尽的了解可能仍会遇到难题。例如：

（1）病害的诱导是一个复杂的过程，已经证明某些病毒病害的诱导需要两个或更多病毒基因的功能。

（2）现在已经知道一个单一的突变可能影响两个或多个功能的各种可能机制。

（3）一个基因产物可能有两个或多个功能，在病毒侵染循环中的重要性不同。

所以从实用的观点来看，仅仅根据核苷酸序列来建立一个科内或组内病毒及株系间

的亲缘关系可能把问题过于简单化了。

第Ⅸ节　关于起源和进化的推测

一个生物体的最基本的特性是其基因组的大小。在这方面，病毒可侵染基因组横跨几乎达三个数量级（orders of magnitude）的所有类型的生物（图 1.4）。最小的病毒——STNV 的基因组由编码病毒衣壳蛋白的单顺反子 mRNA 组成。最大的病毒（传染动物）的基因组大约跟最小细胞的基因组一样大。这类变异性如此之大的病原是从哪里、在何时出现的呢？它们是在何时开始以及如何进化的呢？

虽然通过对病毒结构、复制以及正常细胞的分子生物学的研究已经知道了大量相关的信息，但病毒的起源和进化只是刚从推测的领域（realm of speculation）浮现。然而，这一主题是广受关注、而且与分类这一难题有关的。要对这些主题进行有意义的讨论，我们除了考虑侵染植物的病毒之外，也要考虑其他组群的病毒。

在讨论病毒的进化时，我们必须认识到它与病毒病害的进化不是一回事。一种新的病害可能是病原病毒“进化”的结果，但是也可能在病毒方面并没有改变（Nathanson *et al.*，1995）。例如，一种“老”病毒移动到一种新的环境中可能造成新的病害。可可肿枝病在西非的流行和水稻东格鲁病在东南亚的流行可能是由于病毒从无症的（asymptomatic）自然寄主传播到该地区的新寄主种类上或改变了的农艺环境造成的。

考虑病毒起源时，应该记住植物病毒有三种基本类型的基因组：RNA→RNA 复制的基因组，DNA→RNA→DNA（反转录）复制的基因组和 DNA→DNA 复制的基因组。这 3 种类型的基因组很可能有不同的进化途径，但是现在还不知道它们是否起源于同一种大分子（macromolecule）。聚合酶结构的相似性（参见第 8 章第Ⅳ节 B.1）说明它们可能有共同的基本起源，尽管它们也可能是趋同进化（convergent evolution）的结果。因此，没有足够的理由说明所有的病毒都以同样的方式产生。此外，起源于一种主要组群生物的病毒现在可能主要存在于或只侵染另外一个组群的生物。Gibbs 等（1999）综述过植物病毒的起源和进化，Domingo 等介绍过普通病毒的起源和进化（1999b）。

第Ⅹ节　进化的类型

A. 微观进化和宏观进化

在本章的前面几节中，已经讨论过植物病毒的变异及其分子基础。该变异为选择压力提供材料，并最终导致病毒的进化。不同形式的变异在进化的水平或类型上重要性不同（图 17.8）。

因此，株系主要是根据改变准种云（quasispecies cloud）中主序列（master sequence）的突变、小的插入或缺失等来区分。这可能以称作微观进化（microevolution）。重组和（或）新基因的获得等造成的较大和更根本的变化称作宏观进化（macroevolution），它将导致新的病毒属或科的产生。这从本质上开始了一个新的准种云，

在进一步的微观进化的分化（diversification）中进行选择。

由于一个病毒分离物种群结构的关系，微观进化可能是一个连续的过程。然而，如 Holland 和 Domingo（1998）所言，极高的突变率不一定导致迅速的进化。就像下面（第Ⅹ节 C）将要讨论的，有证据表明有些植物病毒现在分化得很快，而其他一些看起来非常稳定。与高等生物的进化一样，病毒在变化大的环境中进入快速分化时期，而在它们适应了新环境之后进入相对稳定的阶段。选择压力（selection pressure）将在第ⅩⅢ节加以讨论。

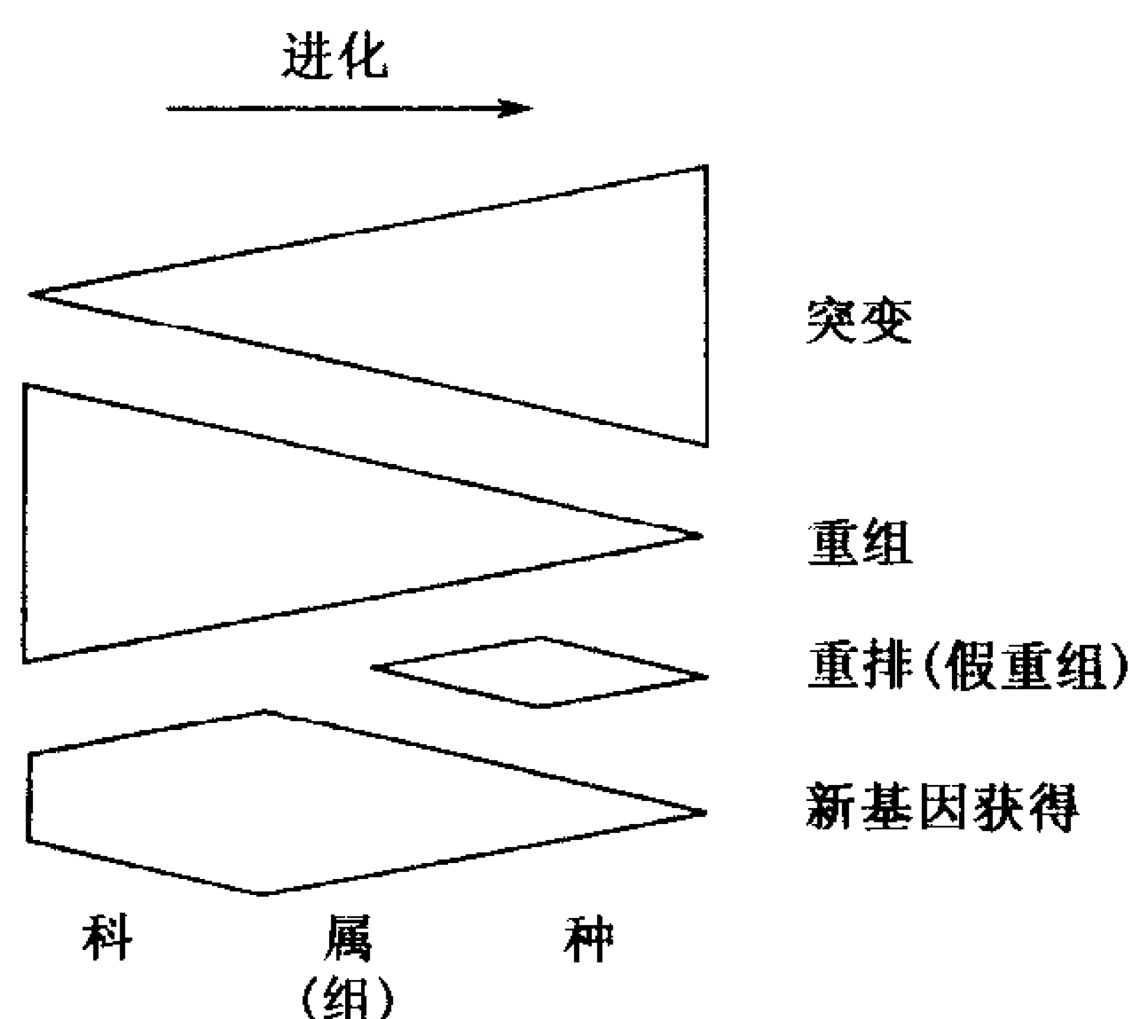


图 17.8 某些影响病毒进化的遗传变异的表观相对重要性。承蒙版权所有者（© The Cambridge University Press）惠允，引自 Gibbs 和 Keese（1995）。

宏观进化是更加罕见和逐步的过程。大多数病毒序列间或获得新基因的重组事件对病毒是致死性的或有害的。然而，病毒形成具有新特性的基因组而且使它比其祖先更成功是很少发生的事件。稍后在本节中我们会介绍这样的例子。

微观和宏观进化不一定是独立的进化系统。很可能一种病毒的微观进化的改变会导致其他病毒序列重组"热点"的形成。同样地，不是所有的重组事件都会导致主要的变化。近同源序列之间的重组会产生同亲代序列只有微小差别的新的序列组合。因此，微观和宏观进化只是程度的不同。

B. 序列的趋异（divergence）或趋同（convergence）

两个基因之间的序列相似性并不一定表明二者之间的进化关系（同源性）。如果没有其他证据，就无法证明这两个基因之间的序列相似性是由于有协同进化起源还是趋同的结果。前肠发酵室（fermenter）中的溶菌酶（lysozyme）就是一个序列趋同的好例子（Stewart and Wilson，1987）。前肠发酵（foregut fermentation）已经在胎盘哺乳动物（placental mammal）中独立地进化过两次，首次发生于反刍动物（ruminant）中，后来一次发生于 Colobine 猴中。在两种情况下，溶菌酶 C 都是在真胃（true stomach）中行使功能。沿着叶猴（langur）溶菌酶谱系中的半数氨基酸替换与更早的沿着母牛胃溶菌酶谱系的进化是相平行的或趋同的。这种趋同是为了适应胃的含有酸性胰蛋白酶（acidic pepsin）的环境这一选择压力所驱动的。类似的趋同现象可能在病毒基因进化的过程中时常发生。然而，对于这样的基因很难像对胃中的溶菌酶那样获得独立的证据证明趋同现象。足以导致血清学交叉反应的氨基酸序列相似性（sequence similarity）可能像发生于 TMV 的衣壳蛋白和核酮糖二磷酸羧化酶的大亚基之间的情况一样是偶然产生的（Dietzgen and Zaitlin，1986）。

Zanotti 等（1996）支持依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶的趋同进化这一观点。然而，该观点受到其他人的质疑（Koonin and Dolja，1993；Gorbalenya，1995），他们认为该基因的进化是趋异的（divergent）。

C. 模块式进化

模块式进化（modular evolution）的过程是 Botstein（1980）为 DNA 噬菌体提出的，但现在人们认为也适用于 RNA 病毒。有人提出病毒是通过可互换的元件（element）或模块（module）之间的重组重排（recombinational rearrangement）或重配而进化的。模块被定义为可互换的遗传元件（genetic element），每一个都执行特定的生物学功能；如复制酶蛋白、衣壳蛋白和调控系统。这种交换使模块在各种选择条件下发生独立进化。这样的模块移动性（modular mobility）能克服所有模块必须在同一个基因组单元（genomic unit）内协同进化时发生的进化限制。

模块进化的要素包括：

（1）进化的产物是自然选择的、独立时处于最佳工作状态、并一起占据特定生态位的模块的有利组合。

（2）两种或更多病毒共同侵染寄主对于模块新组合的装配是必需的。病毒不是必须要系统侵染一种寄主；它们只需要在同一个细胞内复制。这能导致病毒寄主范围的改变。

（3）同一“杂种”种群中的病毒在任何特性上都可能有很大差异，因为这是单个模块功能的不同方面。

（4）进化主要作用于单个模块的水平上，而不是在完整病毒的水平上。在模块水平进行选择是为了更好地执行功能，保留合适的调控序列及与该基因组上的其他大多数（如果不是全部）模块的功能相容性（functional compatibility）。

越来越多的证据支持植物病毒宏观进化的模块机制，这将在下面加以说明。模块以前从何处来的问题将在第Ⅺ节中讨论。

D. 病毒进化的证据

迄今为止尚未发现化石病毒（fossil virus）。有一些可能还有待去发现，例如，在保存于琥珀中的昆虫体内。同时，病毒进化的证据必须来自于对当今的寄主中的当今病毒的研究。当前大部分关于病毒进化的观念和概念都是基于正以相当速率积累的分子数据（分子化石）。基因组组构的比较和详细的序列资料为阐明许多植物病毒的进化途径提供了证据。下面将介绍如何分析数据，以及 6 个病毒组的证据，以说明当前关于植物病毒进化的观点。

1. 系统发育分析

有许多方法可用来推算序列的系统发育或其他的关系（Weiller *et al.*，1995）。这些方法的主要目的是分析核酸或氨基酸序列数据以揭示其相互关系。因此，重要的步骤是对用于分析的数据的记录和陈述，以及对分析结果的解释。分析分子序列信息的理论、方法和实践是几部专著（monograph）的主题（如 Waterman，1988；Doolittle，1990；Gribskov and Devereux，1991）。

a. 序列的比较

比较两个序列以确定其是否有序列相似性（sequence similarity）区域的最简单方

法是点阵法（dot plot）即点图表（dot diagram）（Gibbs and McIntyre，1971）。在这种方法中，两个序列被放在成直角的两个边上，形成一个矩形点阵（rectangular matrix）的邻近区域，当一行或一列有相同的序列元件相交时就画一个点（图17.9）。在实践中，经过比较一段事先定好大小的序列的重叠窗（overlapping window），预先选出相似性记录为一个点以上的值以减少“背景”点。序列相似性表现为沿着对角线分布的点，很容易用眼睛观察。对这一点阵（dot matrix）的偏离将揭示出所比较的两个序列的特征。例如，突变使对角线上出现不连续区，插入或缺失导致这些点从一个对角线方向（diagonal）转变为另一个对角线方向，序列的重复导致平行对角点线（parallel diagonal runs of dots）的出现。

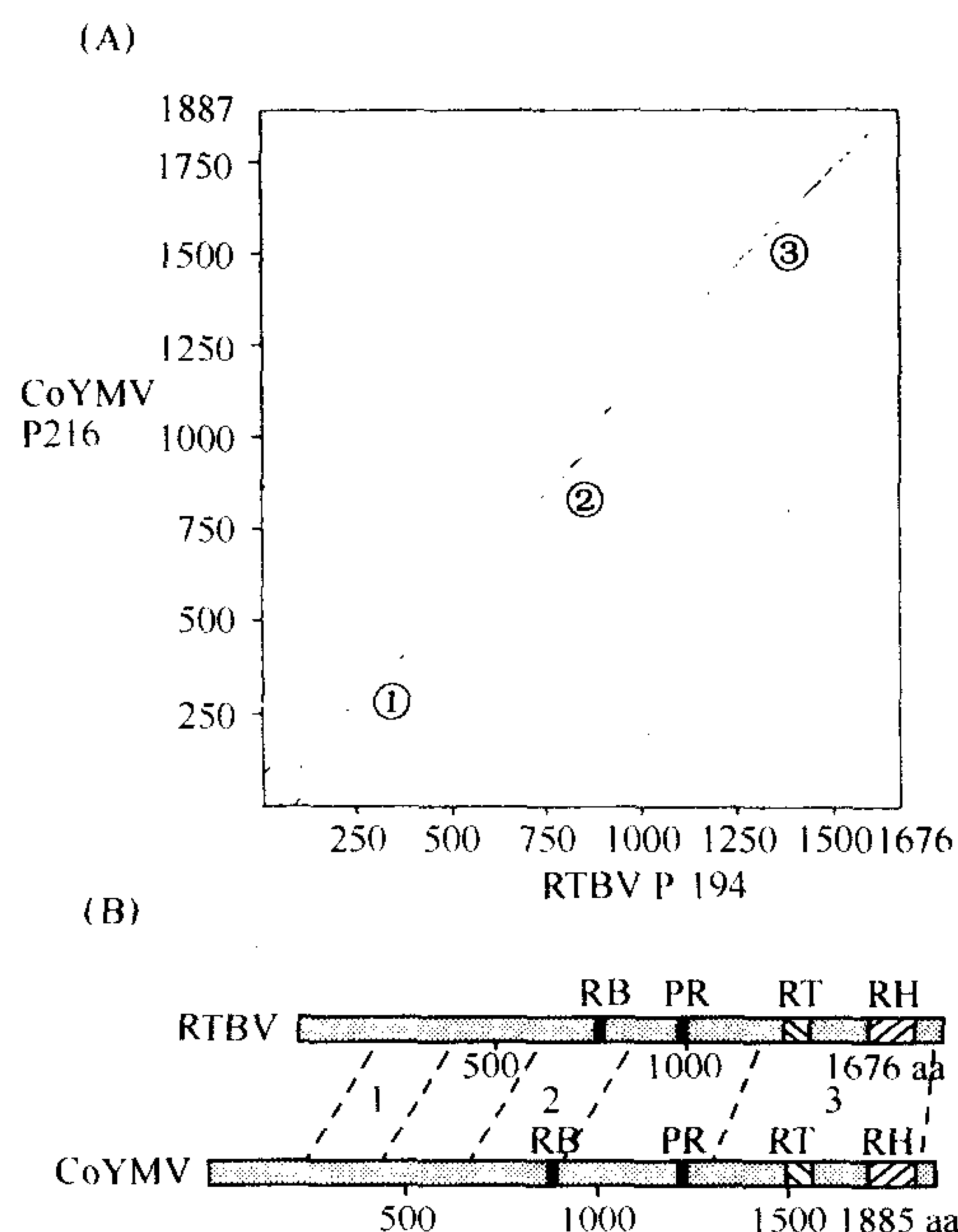


图 17.9 （A）利用 DIAGON 比较 RTBV P194 和 CoYMV P216。鉴定出来的3个有同源性的主要区域如图中所示。（B）RTBV P194 和 CoYMV P216 各个功能域的空间分布比较。RB，RNA-结合结构域；PR，蛋白酶结构域；RT，反转录酶结构域；RH，RNA 酶 H 结构域；aa，氨基酸。（A）中鉴定出的同源区域也均显示出来。承蒙版权所有者（©The Oxford University Press）惠允，引自 Hay 等（1991）。

序列也可用各种各样的计算机比对（alignment）程序来比较。这些程序一般可通过在一个或另一个序列中加入空位（blank）得出最佳的序列比对结果。已经用点阵法证明是相关的成对数据用这种方法最好。有两种类型的序列比对方法。整体方法（global method）旨在发现全部序列中最佳对比结果而局部方法（local method）只试图鉴定短区域的相似性而不必比对这些区域之间的序列。序列对比的程序（McClure *et al.*，1993），其中一个非常有用的程序可以根据氨基酸的性质将它们显示成不同的颜色。这使我们可以根据氨基酸的特性（碱性或酸性、极性或非极性）进行手工比较而不必比对特定的残基。

通过氨基酸序列的多重比对，可以鉴定特定蛋白质（如酶）的特征性序列模体（motif）。本书前面章节中介绍了病毒蛋白中的各种模体（如那些参与 RNA 复制的模体，参见第8章第Ⅳ节B）。通过鉴定序列模体、与数据库中的序列进行比较可以确定待鉴定蛋白质的功能以及它与已知蛋白质亲缘关系的密切程度。虽然迄今为止这种搜索大多不能解释病毒蛋白的功能，但随着数据库中数据的迅速增加，尤其是植物基因组序列的增加，结合可进行重复搜索（reiterative search）的高级计算机程序，将会揭示出更多的亲缘关系。

b. 重构系统发育

序列的多重比对和（或）表明序列相似性细节数目的列表不能给出进化关系或途径的简单解释。目前有两组重构系统发育（phylogeny）的方法。表型性方法（phenetic

method）是在完全不了解进化途径的前提下使用表现型数据重构系统发育。分支分类法（cladistic method）通过试图推测祖先、把重点放在进化途径上。最初，分支分类法好像有一定的优越性，但用于推测祖先的标准可能是无效的，因而会导致错误的结论。在实践中，人们必须使用实用的方法，可能表型性方法和分支分类方法是同样有用的。系统发育关系通常用由称作根、茎、分支（branch）、节（node）和叶（leaf）等各个部分组成的树或树状图（dendrogram）来表示。有不同形式的进化树，也有不同的构建方法（图 17.10）。Weiller 等（1995）详细介绍过这些方法，其优点和缺点不在本书介绍的范围。

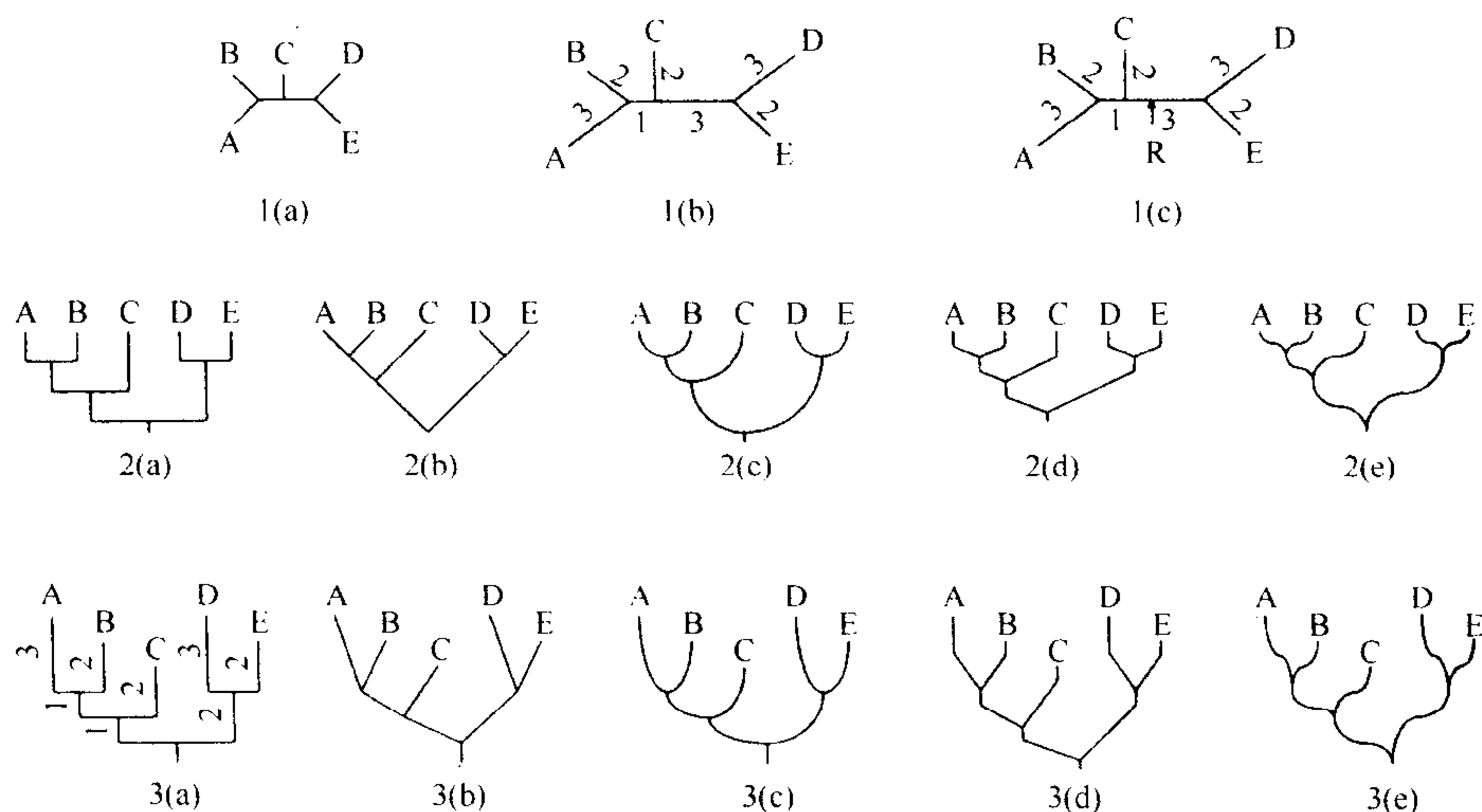


图 17.10 树状图的类型。1（a）～（c）是作为不定向图的无根树（网络状）；1（a）是未经加权处理的，只代表相互关系；1（b）经过加权处理，给出了相对边缘长度；1（c）标出了可能的根“R”，它位于最不相同的 OTU（operational taxonomic unit，操作分类单位，也称数值分类单位，一个可以代表许多类型可比较的分类单位的普通术语），即 A 和 D 路径的中点。2（未经加权处理的）和 3（经加权处理的）是代表 1（c）的有根的树状图；（a）是表观树状图（phenogram），（b）是支序图（分支进化树）（cladogram），（c）是 curvogram 图，（d）是 eurogram 图，（e）是 swoopgram 图。承蒙版权所有者（© The Cambridge University Press）惠允，引自 Weiller 等（1995）。

然而，在确定进化关系时，认识到不同类型树状图的局限性是很重要的，分析树内分支的统计显著性（statistical significance）也很重要。Weiller 等（1995）评论过这些统计方法的优缺点，他认为没有哪一种构建进化树的方法比其他方法更好，因此建议对每个数据集（data set）均使用一种以上的方法，然后比较这些结果。

2. 雀麦花叶病毒科

雀麦花叶病毒科（*Bromoviridae*）成员的基因组分成 3 个正链 RNA 片段（参见第 6 章第Ⅷ节 A）。有证据表明该科成员的进化中既有重配又有重组。通过比对氨基酸序列对黄瓜花叶病毒属病毒进行系统发育分析表明，用 3 个不同的基因组片段加以比较时可揭示出种间的不同关系（White *et al.*，1995）。这表明重配事件产生了现在的分离物。此外，有人发现了 CMV 和 PSV 间的种间假重组体（pseudorecombinant）。然而，

用RNA酶保护分析法（RNase protection assay）对采集自11个自然种群的217个田间分离物进行分型的结果表明选择压力对重配有不利影响（Fraile *et al.*，1997b）。

根据血清学数据可以把CMV分为两个亚组，而序列数据表明第一亚组（subgroup Ⅰ）还可以进一步细分（Palukaitis *et al.*，1992；Chaumphik *et al.*，1996）。将两种黄瓜花叶病毒属的病毒——CMV和TAV共同接种到烟草上，在最低选择压力下生长，结果二者的RNA 3发生了重组（Aaziz and Tepfer，1999）。对26个分离物RNA 3的5′非翻译区进行比对的结果鉴定出这一区域内可能发生过重排、缺失和插入，它们可能是各亚组随后分化（辐射，radiation）的前体（precursor）（Roossinck *et al.*，1999）。系统发育分析表明3个亚组呈辐射状进化，每个亚组都有一个起源。Roossinck（2001）对CMV作为RNA病毒的一个模型做了介绍。

3. 长线病毒

第6章（第Ⅷ节F）中介绍过长线病毒科（*Closteroviridae*）成员（Karasev，2000）的基因组组构，并在图6.33和图6.34中加以说明。这些病毒有植物病毒中最大的正链RNA基因组。Dolja等（1994）描述了长线病毒（closterovirus）基因组的模块组织（modular organization），鉴定了4个模块。（就在本书写作的过程中，有些原来的长线病毒已经归到其他属；因此，这些评述只适用于严格意义上的长线病毒。）BYV的核心模块（core module）包括RNA复制需要的关键结构域——甲基转移酶（MTR）、解旋酶（HEL）和依赖于RNA的RNA聚合酶（POL）（在ORF 1a和ORF 1b中；图6.33），属于甲病毒超家族（alphavirus supergroup）（参见第8章第Ⅳ节B.1）。上游的附属模块（accessory module）是ORF 1a编码蛋白的N端的木瓜蛋白酶型的蛋白酶（papain protease，P-PRO）。伴侣模块（chaperone module）通过一段很短的基因间间隔区与核心模块分开，组合了一个小的疏水蛋白（ORF 2）、HSP70类似物（ORF 3）和与HSP90有相似性的64 kDa蛋白质编码区（ORF 4）。第4个模块包含3′端的可读框5、6、7和8，包括主要的和次要的衣壳蛋白。很明显，CTV每个模块的组成有轻微的差异（表6.5）。

Dolja等（1994）认为长线病毒（closteroviruses）基因组起源于一个共同的祖先，有那一段基因组的重排，并通过重组获得其他模块。甲病毒超家族的祖先可能包括编码MTR、HEL、P-PRO、POL和衣壳蛋白等的基因复合体。他们提出了如图17.11所示的进化途径。

该进化途径包含了下列各项步骤：①P-PRO从复制基因的核心缺失；②假定的甲病毒属病毒（alphaviruses）型衣壳蛋白被一种能形成长形病毒颗粒的衣壳蛋白所取代；③POL表达的移码机制的出现（参见第7章第Ⅴ节B.10.b）；④从细胞基因组获得HSP70；⑤衣壳蛋白的重复和能促进蚜虫传播的串联拷贝（tandem copy）的功能转换；⑥在MET与HEL顺反子之间插入长的编码序列；⑦再次获得前导区（leader）P-PRO，可能是从马铃薯Y病毒属病毒或一个相关病毒获得的；⑧附加的多样性与3′端基因的获得；⑨基因组分离成两个组分，产生毛形病毒属病毒（criniviruses）的基因组组构。

一般认为第1和第2步骤在进化的早期发生，产生了整个烟草花叶病毒属病毒簇（tobamovirus cluster）的一个共同的祖先。其他事件的顺序可能是随机的（arbitrary）。

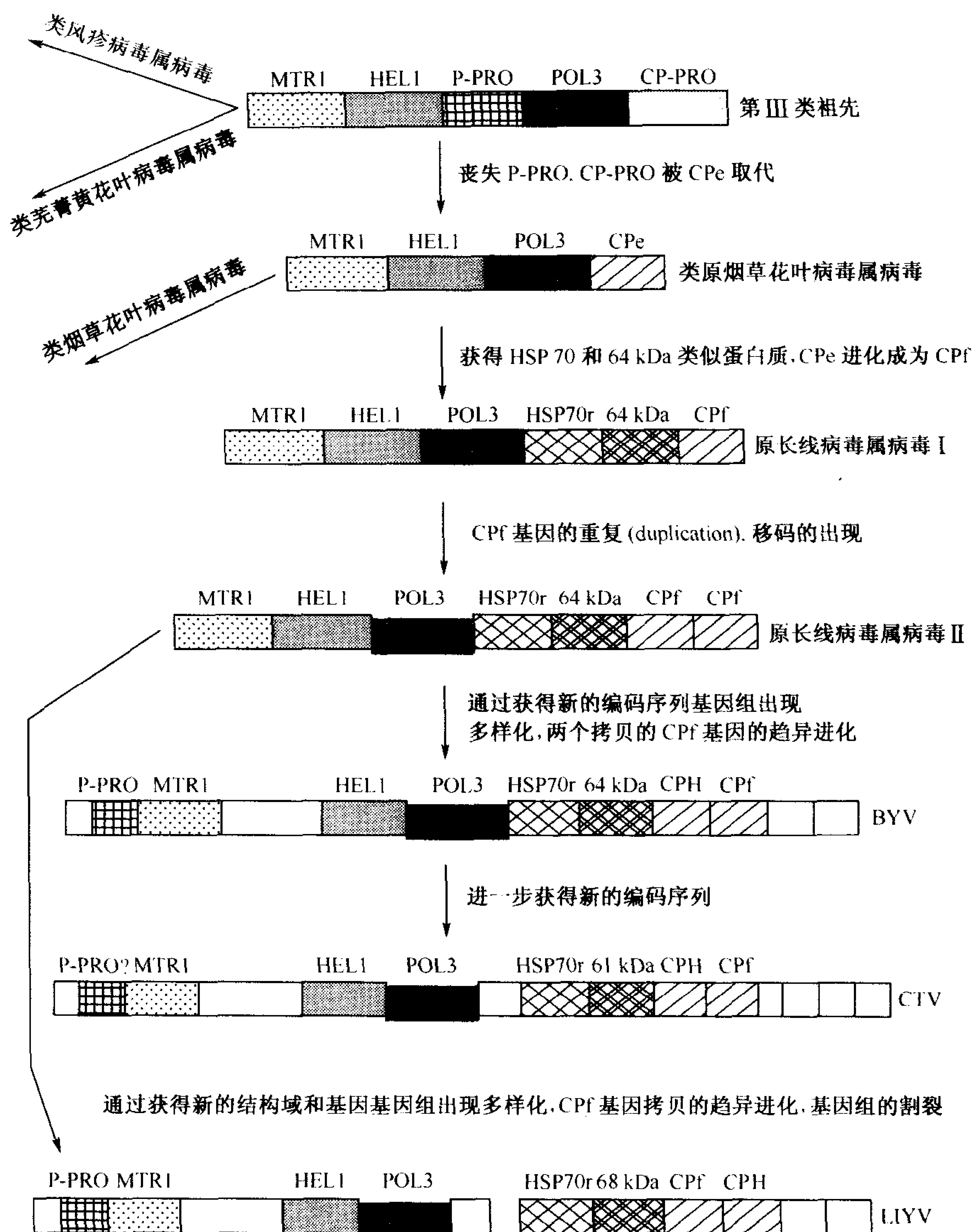


图 17.11 关于长线病毒进化的推定假说。CPe 表示长形粒子衣壳蛋白（一个杆状和线状病毒衣壳蛋白的可能祖先）。CPH，衣壳蛋白类似物；HEL1，超家族 1 的 RNA 解旋酶；HSP70r，HSP70 相关蛋白；MTR1，类型 1 的甲基转移酶；POL3，超家族 3 的聚合酶；P-PRO，类似木瓜蛋白酶的蛋白酶。承蒙版权所有者［©Annual Reviews(www.AnnualReviews.org)］惠允，引自 Dolja 等（1994）。

重组是提出的这一个进化途径的必要部分。对几种 CTV 缺陷型 RNA 的分析表明它们可能是由一段亚基因组 RNA（sgRNA）和 CTV 基因组 5′端的远端重组而成的（Bar-Joseph *et al.*，1997）。有人认为长线病毒属病毒能够利用 sgRNA 和（或）它们的启动子信号进行模块交换及其基因组的重排。尽管有变异的潜力，一项研究表明在不同地理位置（西班牙、中国台湾、哥伦比亚以及美国的佛罗里达和加利福尼亚）不同采集时间、保存在不同的柑橘类寄主中的 CTV 弱毒分离物惊人地相似（Albiach-Martí

et al.,2000a)。这说明有些 CTV 种群存在着高度的进化停滞(evolutionary stasis)。

4. 黄症病毒科病毒

在第 6 章(第Ⅷ节 B)中介绍过黄症病毒科(*Luteoviridae*)3 个属的正链 RNA 基因组的组构,并在图 6.35 中绘出。Gibbs(1995)将含有正单链 RNA 基因组的小等二十面体病毒划分为 3 个超级组(supergroup),现在形成了黄症病毒科(*Luteoviridae*)、番茄丛矮病毒科(*Tombusviridae*)和南方菜豆花叶病毒属(*Sobemovirus*)等分类单位。这些病毒的基因组组构包含两个基本模块,即 5′复制酶蛋白和包括病毒粒体衣壳蛋白在内的 3′端蛋白质。对 RdRp 和衣壳蛋白进行系统发育分析的结果(图 17.12)表明该超级组成员的模块之间已经发生了基因转移事件。

系统发育分析显示这一超家族可以分为两个主簇(main cluster):耳突花叶病毒簇("enamo" cluster)和香石竹斑驳病毒簇("carmo" cluster)。在这两个主簇之间和每个簇之内都发现了可能的基因转移。

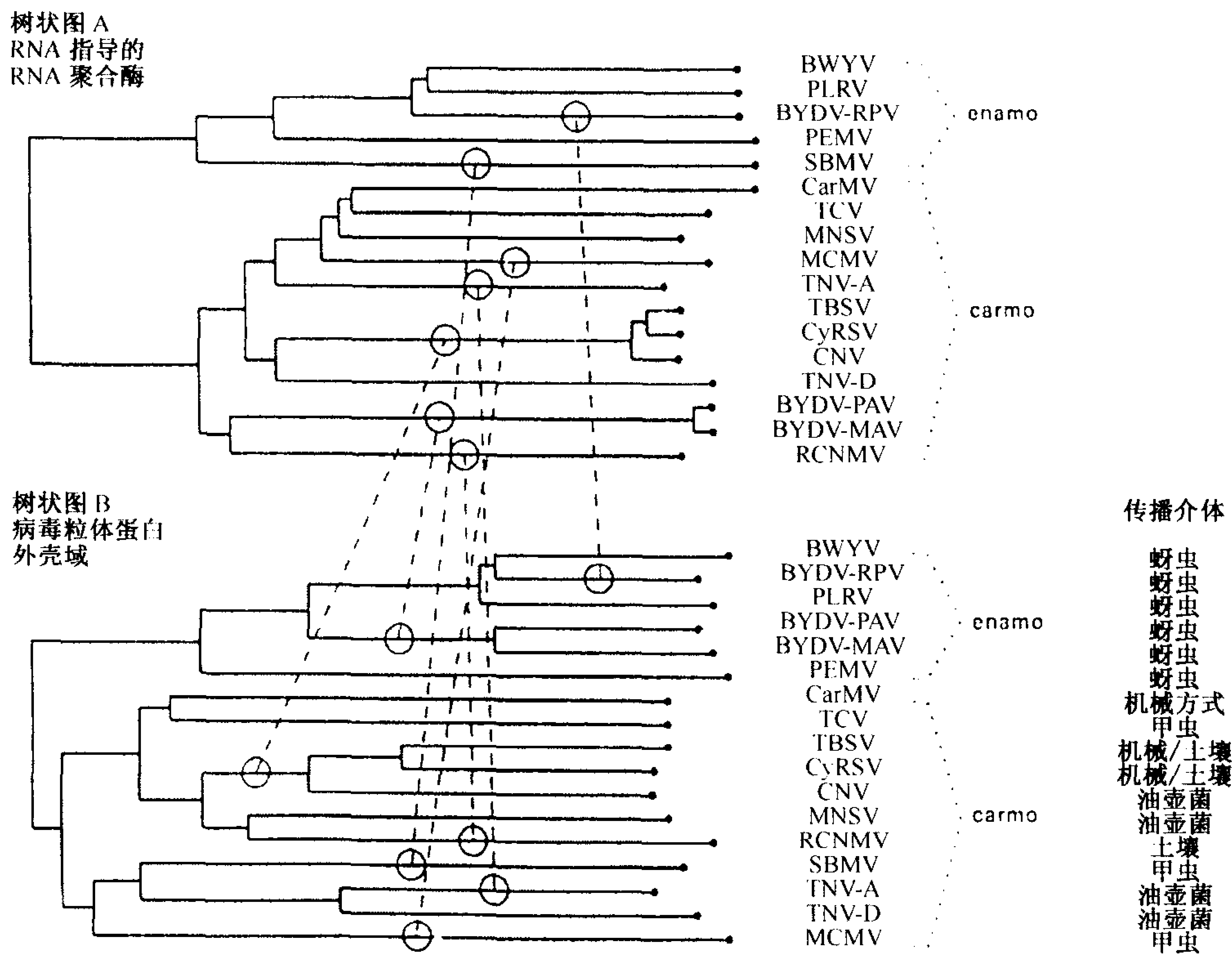


图 17.12 黄症病毒"超级组"已经测序的 17 个成员基于 RNA 指导的 RNA 聚合酶和病毒蛋白外壳域氨基酸序列的分类(分别是树状图 A 和 B)。连接两个树状图的虚线代表这一"超级组"两个主簇之间可能的基因转移事件。树状图是根据完整序列比对后得到的每对序列间的进化距离通过邻接法推测出来的。转移事件的形式是根据不同基因遗传谱系的不协和性(incongruity)估测的。连接线是在将两个不协和性非常明显的节连接起来的线的中点随意画的,因为不可能估计一个不协和的谱系内转移事件在哪个点发生。导致 PLRV 和 BWYV 的谱系假定为是协和的,这样可使这一亚簇内聚合酶和病毒粒体蛋白的比例异常最小化。导致 CarMV、TCV、MNSV 和 TNV-D 的谱系在香石竹斑驳病毒这一簇内是协和的。在病毒粒体蛋白树的旁边标出每一种病毒的传播方式。经版权所有者(©The Cambridge University Press)惠允,引自 Gibbs(1995)。

黄症病毒科现在分为3个属——黄症病毒属（*Luteovirus*）（属于香石竹斑驳病毒簇）、马铃薯卷叶病毒属（*Polerovirus*）和耳突花叶病毒属（*Enamovirus*）（属于耳突花叶病毒簇）（图17.12）。

关于黄症病毒属和马铃薯卷叶病毒属基因组组构的进化已提出各种不同的模型。这两个属的P3序列有明显的序列相关性，ORF 3、ORF 4和ORF 5的结构也明显相似（图6.35）。然而，这两个属5′ ORF的排列和组成非常不同。图17.13说明了这两个属基因组起源的最可能的模型（Miller *et al.*，1997）。这个模型假设，重组是由于受两种亲代病毒共同侵染的细胞中RNA复制时在亚基因组RNA起始位点的链的切换（strand switching）引起的。至于黄症病毒基因组的衍生（derivation），类似香石竹病毒属病毒（dianthoviruses）的亚基因组起始位点和马铃薯卷叶病毒属病毒有同源性。在这一个位置的重组会产生一种具有香石竹病毒属病毒（dianthoviruses）的聚合酶、马铃薯卷叶病毒属病毒的衣壳蛋白和邻近基因的杂种病毒（hybrid virus）。位于ORF 5下游的sgRNA起始位点的一个重组事件产生了黄症病毒完整的基因组组构。南方菜豆花叶病毒属（*Sobemovirus*）的一个成员的5′端和黄症病毒属的一个成员3′端的一次重组，接着发生提前终止（premature termination），这导致了马铃薯卷叶病毒属病毒基因组组构的产生（图17.13）。

对于黄症病毒科内病毒的重组还有更进一步的明显证据。重组事件可以分为3种类型：一个基因内的重组，属内大段基因组的重组和属间基因组大片段的重组。在对黄症病毒属病毒通读蛋白（ORF 3＋5）的分析中可以发现基因内重组的例子（Gibbs and Cooper 1995）。CABYV和PEMV的祖先之间可能有一次重组事件使PEMV的通读蛋白的5′端转移到CABYV的相应区域。至于第二个类型的事件，BMYV似乎是马铃薯卷叶病毒属两个成员间的一个嵌合体（chimera），含有ORF 0、ORF 1和ORF 2的5′端序列与CABV相似，而覆盖ORF 3、ORF 4和ORF 5的3′端区域与BWYV相似（Guilley *et al.*，1995）。有证据表明，在黄症病毒属病毒和马铃薯卷叶病毒属病毒中至少有两种病毒发生了属间重组。SbDV的基因组排列（Rathjen *et al.*，1994）说明它应该属于黄症病毒属（*Luteovirus*），因为①它没有ORF 0；②ORF 1相对较小，与ORF 2只有几个核苷酸的重叠；③RdRp像香石竹斑驳病毒属病毒；④5′UTR和3′UTR包含那一个属的典型序列。然而，SbDV ORF 3、ORF 4和ORF 5的产物更像典型的马铃薯卷叶病毒属（*Polerovirus*）成员。因此，SbDV基因组像是两个属之间的一个杂种。对ScYLV基因组的核苷酸序列进行的系统发育分析证明，ORF 1和ORF 2最接近马铃薯卷叶病毒属病毒的相应基因，ORF 3和ORF 4与黄症病毒属病毒的相应基因密切相关，ORF 5与目前唯一的耳突花叶病毒属病毒（enamoviruses）的通读蛋白相关（Moonan *et al.*，2000；Smith *et al.*，2000）。ScYLV基因组上的两个重组位点已定位于已知的亚基因组RNA转录位点。

如第11章（第Ⅲ节H.1.a）中所述，黄症病毒科病毒在生物学上与其他病毒，尤其是幽影病毒属病毒（umbraviruses）密切相关。在这些复合物中，黄症病毒提供衣壳蛋白使幽影病毒属病毒和黄症病毒一起由蚜虫传播。Gibbs（1995）认为像这种复合体这样病毒间的密切联系能给病毒间的重组提供更多的机会。

因此，黄症病毒科内病毒的重组以及该科病毒和其他属的小型单链RNA病毒间的

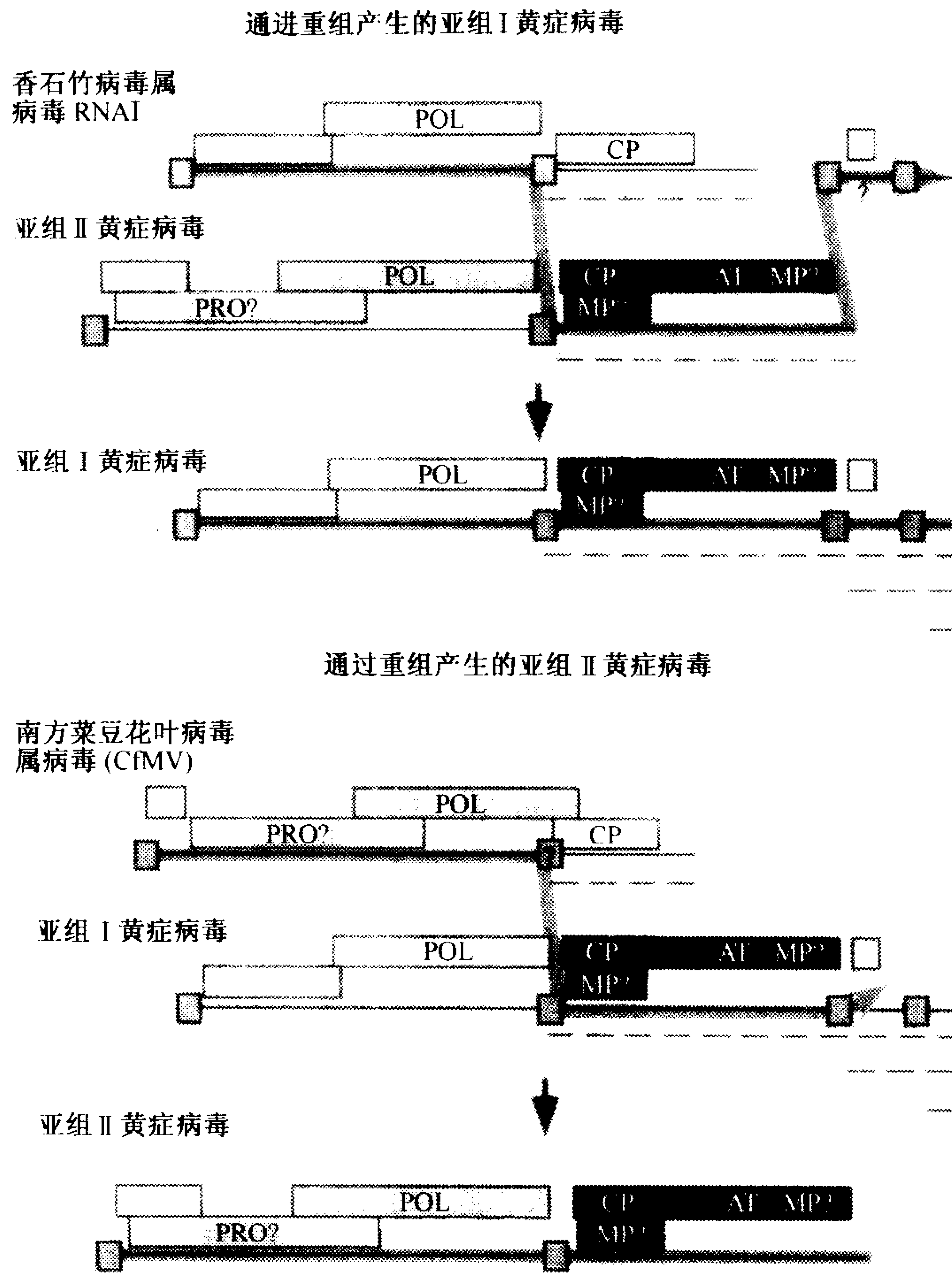


图 17.13 （见彩色图版 17.1）黄症病毒各亚组的起源模型。实心黑线代表病毒基因组 RNA。虚线表示亚基因组 RNA。框表示编码的基因。蓝色阴影，与幽影病毒属、香石竹病毒属和香石竹斑驳病毒属的病毒有序列相似性；绿色，与南方菜豆花叶病毒属的病毒有序列相似性。灰色框代表推定的复制起点和亚基因组 mRNA 启动子。POL，依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶；PRO?，推定的蛋白酶；CP，衣壳蛋白；MP?，推定的移动蛋白；AT，衣壳蛋白基因的通读结构域，可能是蚜虫传毒所必需的。粉红线表示在复合侵染中复制病毒 RNA 时复制酶发生链切换时的途径。承蒙版权所有者（©The American Phytopathological Society）惠允，引自 Miller 等（1997b）。

重组似乎很常见。也有证据表明 PLRV 能够与寄主序列发生重组（Mayo and Jolly，1991）；一个 PLRV 苏格兰分离物的一些 RNA 的 5′端 119 个核苷酸与烟草叶绿体 DNA 的一个外显子非常相似。

5. 马铃薯 Y 病毒属病毒

马铃薯 Y 病毒属病毒有正 ssRNA 基因组，编码一个多聚蛋白，经过酶切加工形成最后的产物（参见第 7 章第Ⅴ节 B. 1. b）。有人曾用衣壳蛋白序列估测病毒间的系统发育关系（Ward *et al.*，1995）。衣壳蛋白有 3 个结构域：一个 N 端区域，一个保守的核

心区和一个较小的C端区域。迄今已利用衣壳蛋白核心区域进行过各种各样的系统发育分析（图 17.14）。

在图 17.14 的两个树状图（dendrogram）中，分枝的基节（basal node）把大麦黄

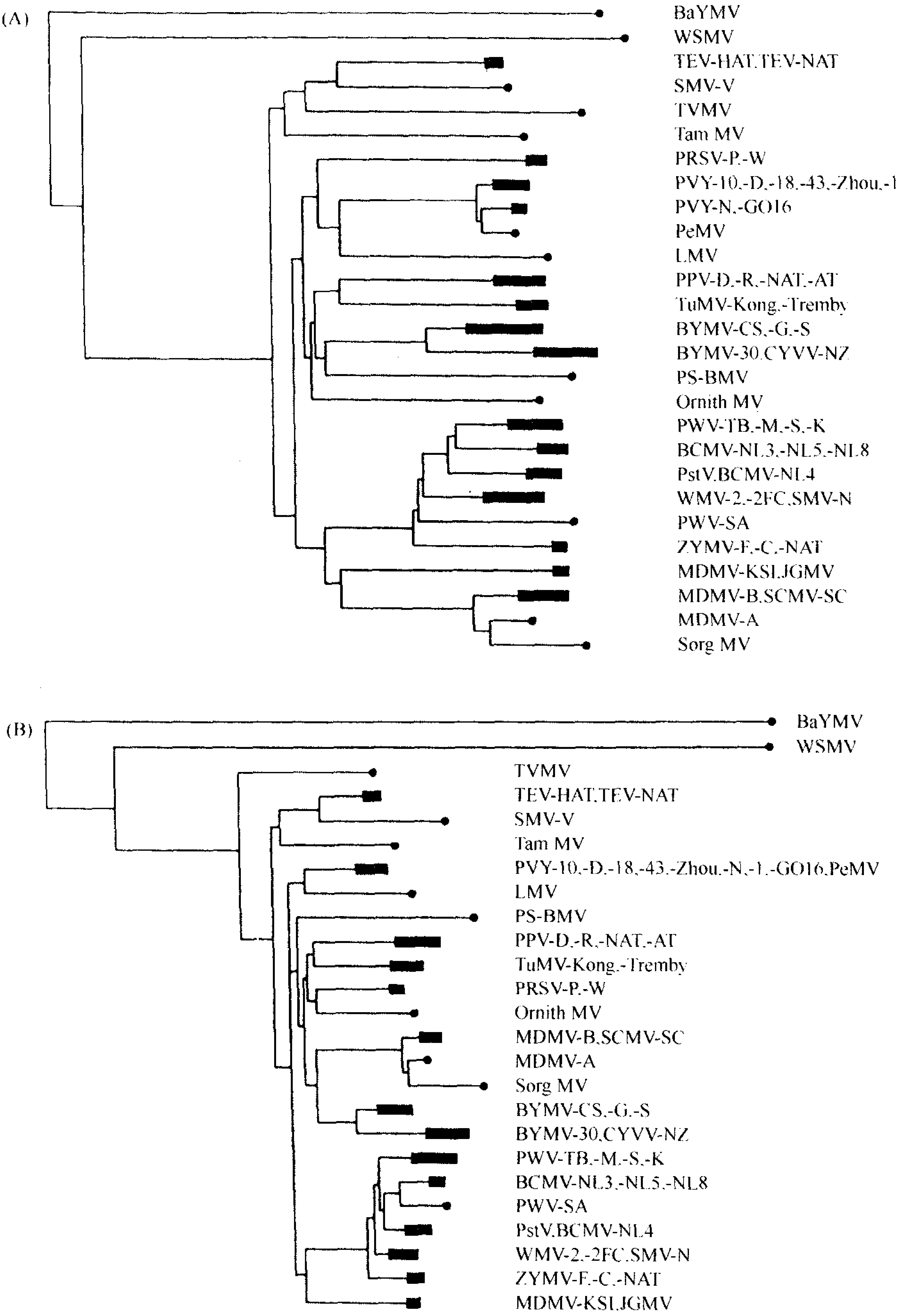


图 17.14 由非同一性百分率（%non-identity）计算的马铃薯Y病毒属病毒亲缘关系的邻接树（neighbor-joining tree）（A）或根据其衣壳蛋白核心区域 core domain 比对的"FJD距离"（Feng *et al.*，1985）（B）。承蒙版权所有者（©The Cambridge University Press）惠允，引自 Ward 等（1995）。

花叶病毒属（*Bymovirus*）的 BaYMV 的衣壳蛋白同其他病毒的衣壳蛋白联结起来。第二个分枝是小麦花叶病毒属（*Tritimovirus*）的 WSMV，第三个分枝将所有蚜虫传播的马铃薯 Y 病毒属病毒联系起来。人们认为这些分类特征与根据寄主和介体专化性的分类一致。大麦黄花叶病毒属病毒（bymoviruses）和小麦花叶病毒属病毒（tritimoviruses）在自然条件下只存在于单子叶植物中，大麦黄花叶病毒属病毒由根肿菌（plasmodiophoraceous fungi）传播，小麦花叶病毒属病毒由瘿螨（eriophyid mite）传播。它们被蚜虫传播的侵染双子叶植物的病毒隔开。然而，最近的一个分析（图 17.15）（Berger *et al.*，2000）并不完全支持这个结果：侵染双子叶植物的甘薯病毒属病毒（ipomoviruses）、侵染双子叶和单子叶植物的柘橙病毒属病毒（macluraviruses）分别与小麦花叶病毒属病毒和大麦黄花叶病毒属病毒的亲缘关系相对较近。在图 17.15 显示的系统发育树中，确实将侵染双子叶植物而且由蚜虫传播的病毒（macluraviruses 除外）归到了一起，将它们与由其他介体传播的病毒属分开。

图 17.15 基于衣壳蛋白氨基酸亲缘关系绘制的马铃薯 Y 病毒科的系统发生树。该推论是基于 Fitch 和 Margoliash（1967）的最小二乘法（least-squares method）。序列用 PILEUP（Devereux *et al.*，1984）进行比对。分枝长度和序列距离成比例。树状图经自引导分析（bootstrap）100 次（自引导数值标在节上），是无根树。许多分支比较密集，可能含有多个病毒。例如，BCMV＋包括 BCNMV、CABMV、DMV、PWV、SAPV、SMV、WMV 和 ZYMV，以及 BCMV 亚组所含有的所有其他病毒（AzMV、BlCMV、DeMV 和 PStV）。同样，标记为 BYMV＋的分支还包括 CYVV、PMV、PSbMV 和 PeMotV。经允许，引自 Berger 等（2000）。

对马铃薯 Y 病毒属病毒的衣壳蛋白 N 端序列进行的分析发现了部分基因重复（partial gene duplication）的证据。例如，SCMV 的两个株系核心区域有 92%的同一性，而 N 端的长度不同，并且只有 22%的同一性（Frenkel *et al.*，1991）。通过比较 N 端区域的序列，发现它们的来源不同，同时有大段序列的重复。这些 N 端序列暴露在

衣壳蛋白的表面，它们的改变不影响对杆状粒子装配非常重要的基本的衣壳蛋白结构。蚜虫传毒所需要的辅助蛋白（helper protein）的识别位点 DAG 就在这个区域（参见第 11 章第Ⅲ节 C. 7. b）。

重组似乎在 YMV 的进化中起到了一定的作用（Bousalem *et al.*，2000）。对 27 个 YMV 分离物覆盖 NIb 的 C 端、衣壳蛋白和 3′非翻译区的区域的分析以及与马铃薯 Y 病毒属的 8 种其他病毒相应区域的比较，发现衣壳蛋白的变异最大。在衣壳蛋白与 3′非翻译区的多态性和系统发育间没有相关性。加勒比地区、南美洲和非洲的分离物之间有地理分化（geographic distinction），以非洲分离物的变异最大。没有证据表明寄主对特定分离物有选择性。Bousalem 等（2000）提出一种假说，认为 YMV 起源于非洲的薯蓣（*Dioscorea cayenensis-D. rotunda*）复合体，独立地传播到参薯（*D. alata*）和三裂叶山药（*D. trifida*）中。

从中国和印度尼西亚采集的 BCMV 的花生条纹株系的分离物之间也有地理分化（Higgins *et al.*，1999），衣壳蛋白基因核苷酸序列的变异率在地理组群（geographic group）内为 3.5%，在地理组群之间为 7.3%。作者认为这一个株系是从不同地点独立出现的。

6. 烟草花叶病毒属病毒

烟草花叶病毒属病毒（tobamoviruses）是研究最多的植物病毒。已经根据核酸序列、氨基酸序列、肽作图、血清学关系和生物学性质等许多数据对其亲缘关系进行了广泛的研究。Fraile 等（1995）和 Gibbs（1999b）先后对该属病毒的进化做了综述。

几对烟草花叶病毒属病毒 4 个编码区（表 17.3）中每个位点上氨基酸替代的平均数的估计表明 54 kDa 区域（ORF 2，图 6.36）最为保守，30 kDa 的移动蛋白变异最大。绝大多数核苷酸替代是同义的（synonymous）（即不引起氨基酸的改变），4 个 ORF 之间没有区别。因此，整个基因组似乎作为一个实体变化，几乎没有重组在多样化（diversification）过程中起重要作用的证据。一个可能的例外是 SHMV，它的 3′非编码区可能来自一种类似芜菁黄花叶病毒属的病毒（tymo-like virus）。

表 17.3　每个位点氨基酸替代的平均数估计值、不同的编码蛋白的 d^a，以及 3′ ncr^b 每个位点核苷酸替代的估计值

基因	ToMV	TMGMV	PMMV	ORSV	SHMV	CGMMV	RMV
126K							
TMV	0.0929	0.4246	0.3064	—	—	0.7967	—
ToMV		0.4108	0.2871	—	—	0.7824	—
TMGMV			0.4480	—	—	0.7899	—
PMMV				—	—	0.8007	—
54K							
TMV	0.0622	0.1999	0.2211	—	—	0.5236	—
ToMV		0.2992	0.1961	—	—	0.5477	—
TMGMV			0.2985	—	—	0.5667	—
PMMV				—	—	0.5327	—

续表

基因	ToMV	TMGMV	PMMV	ORSV	SHMV	CGMMV	RMV
MP							
TMV	0.2384	0.5307	0.3729	0.4397	1.1865	0.9848	—
ToMV		0.4979	0.4054	0.4761	1.0303	0.9822	—
TMGMV			0.4214	0.5017	1.0026	0.9822	—
PMMV				0.3539	1.0671	0.9636	—
ORSV					0.9899	0.9899	—
SHMV						0.9004	—
CP							
TMV	0.1785	0.3415	0.3558	0.3136	0.6424	0.7820	0.7459
ToMV		0.3264	0.3289	0.2792	0.8077	0.9618	0.7657
TMGMV			0.3835	0.3249	0.7722	0.9618	0.6868
PMMV				0.3585	0.8092	0.8625	0.7668
ORSV					0.8518	0.8625	0.7744
SHMV						0.7910	0.8692
CGMMV							0.9556
3′ncr							
TMV	0.3199	1.0578	0.6785	0.8080	1.3837	0.8084	—
ToMV		1.0692	0.6833	0.8317	1.3817	0.8996	—
TMGMV			1.0333	1.1382	1.7285	0.9948	—
PMMV				0.8863	1.7461	0.9192	—
ORSV					1.6126	0.7687	—
SHMV						1.7319	—

注：a. $d=-\log_e n_i/n$，n=蛋白质中氨基酸的平均数目，n_i=两个蛋白质中相同氨基酸的数目(Nei，1987)；b. 3′非编码区(ncr)每个位点核苷酸的替代数是根据 Kimura (1980)的双参数法计算的。126 K 和 54 K、指复制酶的 126 kDa 和54 kDa部分；MP、细胞间移动蛋白；CP、衣壳蛋白；承蒙版权所有者(©The Cambridge University Press)惠允，引自 Fraile 等(1995)。

大量的研究说明烟草花叶病毒属病毒的一些种群非常稳定。例如，20 世纪 80 年代在西班牙和意大利的西西里岛暴发流行的 26 个 PMMoV 分离物的 RNA 指纹图谱（fingerprinting）表明它们有非常高的稳定性（Rodríguez-Cerezo *et al.*，1989）。虽然种群内有一定的变异（可能反映了其准种地位），但在不同地理位置、不同时间采集的病毒的主序列都是相对恒定的。在西班牙南部自然侵染光叶烟（*Nicotiana glauca*）的 5 个 TMGMV 种群的遗传趋异性（genetic divergence）非常小（Moya *et al.*，1993），从澳大利亚、美国加州、西班牙和东地中海流域光叶烟植株上该病毒分离物的遗传趋异性也非常小（Fraile *et al.*，1996）。对 TMV 的体外研究表明同源重组经常发生。例如，插入 cDNA 克隆的重复序列在侵染植物后很快就会被清除（Dawson *et al.*，1989；Beck and Dawson，1990）。但在自然条件下几乎没有重组的证据。同样，把细菌基因插入到病毒基因组中计算 TMV 复制的出错率，结果为 10^{-3}～10^{-5}，与其他 RNA 病毒非常相似（Donson *et al.*，1991；Kearney *et al.*，1991）。但是，TMV cDNA 在 413～515 天的时间内连续转接 7 种寄主植物后突变率非常低，每个碱基每年的突变率为 3.1×10^{-4} 个核苷酸替换（Kearney *et al.*，1999）。因此，烟草花叶病毒属病毒的内在变异性（in-

herent variability）与其他 RNA 病毒相似，而且自然条件下序列的保守性肯定反映出对变株（variant）积累的很多限制因素。

7. 双生病毒科病毒

双生病毒科病毒（geminiviruses）DNA→DNA 的复制比 RNA→RNA 的复制产生的变异应该少（图 8.29）。然而，有证据表明，至少双生病毒科两个属 菜豆金色花叶病毒属和玉米线条病毒属的病毒存在着显著的基因组变异。菜豆金色花叶病毒属病毒（begomoviruses）的基因组和血清学变异广泛存在（Harrison and Robinson，1999），这在很大程度上代表了与地理相关的谱系（geography related lineage），与寄主范围几乎没有关系（图 17.16）。

让玉米叶蝉（*Cicadulina mbila*）介体经过短暂的获毒和接种取食期，把一个最初在多年生的野生寄主上侵染的 MSV 经过一系列转接传播到几乎完全抗病的品种上，得到了 3 个 MSV 分离物（Isnard *et al.*，1998）。对这些分离物的序列分析结果表明，最初的侵染物有准种特征，突变分布于整个基因组上。突变频率估计在 3.8×10^{-4} 和 10.5×10^{-4}之间，与 RNA→RNA 的复制突变水平相似。在 CLCuV AC1 和 AV1 可读框的同义位置（synonymous position）变异率最高（Sanz *et al.*，1999）。不同可读框之间非同义替代和同义替代（synonymous substitution）的比例不同，AV1 中的比例比 AC1 中的高，可读框 AC4 和 AV2 中的比例更低。据认为可读框 AC4 和 AV2 的进化分别受到 AC1 和 AV1 的限制，AC4 和 AV2 是相对新的基因，起源于已经存在的 AC1 和 AV1 基因的套印（overprinting）。

鉴于一般 DNA→DNA 的复制伴随着校正作用，因而双生病毒的致突变变异（mutagenic variation）是出人意料的。Roossinck（1997）曾讨论过这一点，她认为这可能说明缺少复制后的修复。双生病毒的 DNA 看来没有甲基化，因为其复制可被甲基化作用所抑制。因此，虽然这些病毒利用寄主体系进行复制，但寄主正常的错配修复机制可能不起作用。

越来越多的证据表明双生病毒中会发生天然的重组，有时会导致新的病害。例如，ACMV、EACMV 和 ICMV 这 3 种双生病毒可引起木薯（cassava）花叶病（Hong *et al.*，1993）。通过对引起乌干达木薯严重花叶病流行的一种双生病毒（乌干达变株，UgV；见彩色图版 3.21）的序列与 3 种木薯病毒的序列加以比较后发现，该病毒（除了衣壳蛋白外）与 EACMV 的坦桑尼亚分离物相似（Zhou *et al.*，1997）。UgV 衣壳蛋白基因 5′端部分与 EACMV 有 99%的同一性（与 ACMV 只有 79%的同一性），该基因的中间区域有 99%与 ACMV 相同（75%与 EACMV 相同），3′ 端部分有 98%与 EACMV 相同（76%与 ACMV 相同）。这被作为通过 ACMV 和 EACMV 的重组产生 UgV 的有力证据。对喀麦隆（Cameroon）木薯花叶病病原的序列分析提供了重组的进一步证据，这次重组是发生在 DNA-A 的 AC2-AC3 区域和 DNA-B 的 BC-1 区域（Fondong *et al.*，2000）（菜豆金色花叶病毒属病毒的基因组组构见图 6.7）。此外，还有南非木薯花叶病毒发生重组的证据（Berrie *et al.*，2001）。

巴基斯坦的棉花曲叶病的严重暴发与菜豆金色花叶病毒属病毒的多重侵染有关（Zhou *et al.*，1998；Sanz *et al.*，1999；Sanz *et al.*，2000）。有些分离物基因间区（in-

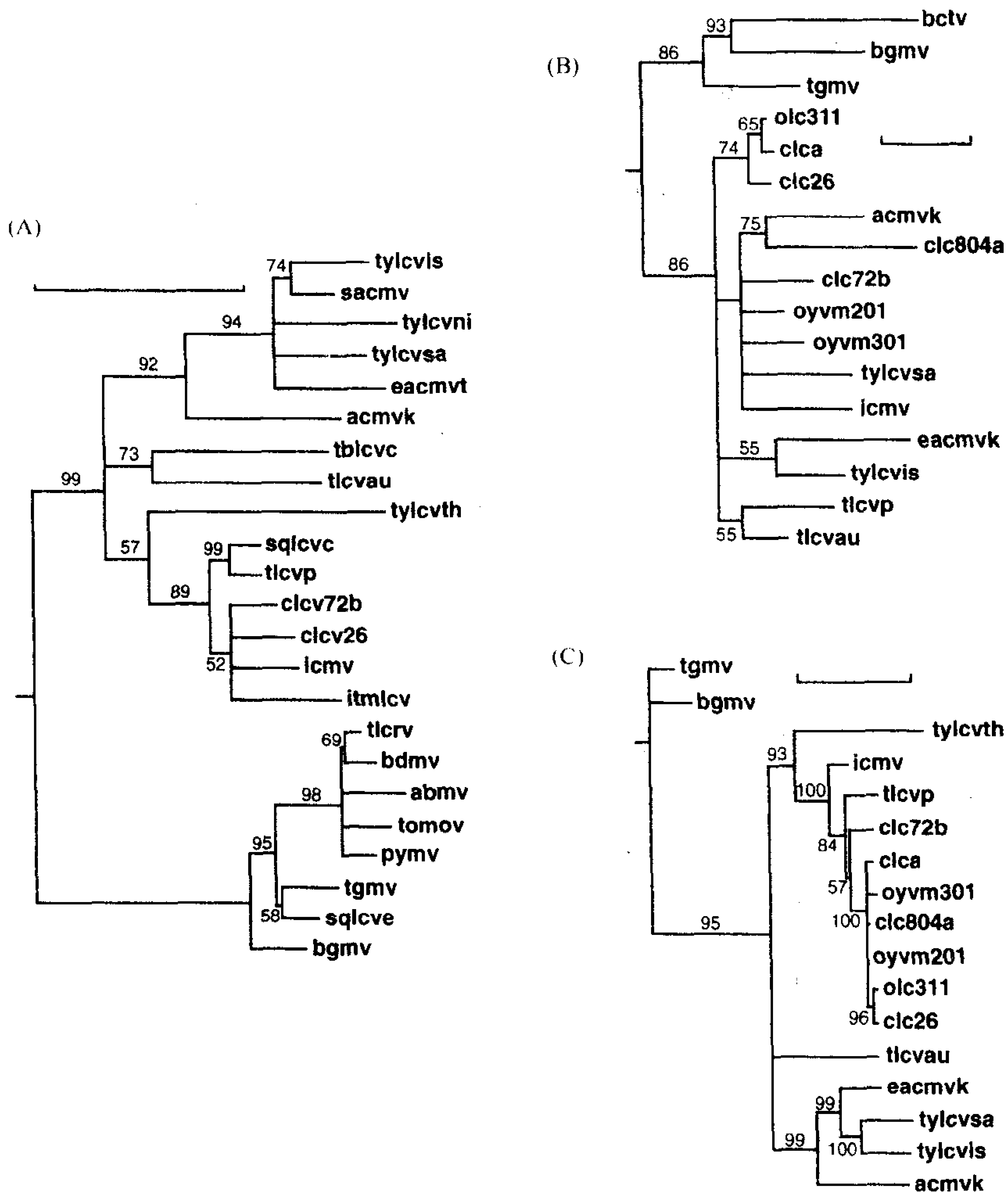


图 17.16 利用 PUZZLE 程序通过比对菜豆金色花叶病毒属病毒氨基酸序列得到的系统发育树。水平标尺代表每个位点有 0.2 个取代。(A) CP，表示包括旧世界（上面的分支）和新世界（下面的分支）病毒的两个主要分支。旧世界病毒的 3 个亚簇非常明显。(B) 和 (C) 分别指从巴基斯坦棉花（clc）或秋葵（olc、oyvm）上分离到的 7 个菜豆金色花叶病毒属病毒分离物和从 5 个大洲选择的其他病毒 Rep 和 CP。注意各个棉花和秋葵分离物在 (B) 和 (C) 中的相对位置不同。Abmv，苘麻花叶病毒；acmvk、eaxmvt、icmv 和 sacmv 分别指非洲、东部非洲、印度和南美洲的木薯花叶病毒；bctv，甜菜曲顶病毒；pymv，马铃薯黄花叶病毒；sqlcvc 和 sqlcve 分别指中国和美洲的南瓜曲叶病毒；thlcvc 指中国烟草曲叶病毒；tgmv，番茄金花叶病毒；tlcrv，番茄皱叶病毒；thlcvau、tlcvp 和 itmlcv 分别是从澳大利亚、新德里和班加罗尔（Bangalore）的番茄曲叶病毒；tomov，番茄斑驳病毒；tylcvis、tylcvni、tylcvsa 和 tylcvth 分别指从以色列、尼日利亚、撒丁岛和泰国的番茄黄色曲叶病毒。承蒙版权所有者［©Annual Reviews（www. AnnualReviews. org）］惠允，引自 Harrison 和 Robinson（1999）。

tergenic region）的 5′端和 3′端有不同的亲和力，并且在几种不同的组合中均有发生，这表明已经发生过重组，而且复制起点是最有利的重组位点（Zhou *et al.*，1998）。可读框 AC1 和 AV1 中也有重组的证据，表明复制起点不是唯一的重组位点，而是主要的

重组位点（Sanz *et al.*，1999）。多重侵染后的重组可以解释印度次大陆的许多双生病毒间的亲缘关系网，及其在其他地理区域引起类似病害的菜豆金色花叶病毒属病毒（begomoviruses）作为一个组的进化趋异性（Sanz *et al.*，2000）。

在墨西哥侵染辣椒（Torres-Pacheco *et al.*，1993）和中美洲侵染番茄（Umaharan *et al.*，1998）的双生病毒中也发现了重组的证据。对 64 种不同的双生病毒的分析表明在整个基因组上有 420 个统计学上显著的重组片段（Padidam *et al.*，1999）。这种高比例的重组可能促进了最近出现的新的双生病毒病害的发生。

双分体的双生病毒可以从不同组分间发生的假重组（pseudo-recombination）产生新变株。Unseld 等（2000）证明两个 SiGMV 分离物之间的假重组体侵染性的逐渐增强与两个组分的病毒特异的适应有关。一个 ToMoV DNA-A 和 BDMV DNA-B 之间的假重组体连续转接导致了一个重组事件的产生，即 DNA-B 的共同区域（common region）被 DNA-A 的共同区域所替代（Hou and Gilbertson，1996）。该重组体的致病性有所增强。

8. 讨论和总结

已经有许多分子证据用于研究几组病毒的进化途径。上面的这些例子不是仅有的，许多其他的病毒组也有相似的证据。

正如第Ⅳ节所述，变异可以通过突变、重配和重组 3 种方式产生。多分体病毒基因组片段的重配（假重组）已经在实验室内用于研究基因功能，但很少有新的病原通过这种方式自然地产生。如第Ⅹ节（D.2）中提到的，至少在雀麦花叶病毒科中有不利于假重组体的选择，但菲律宾的一种纤细病毒属病毒（tenuiviruses）—— RGSV 的天然分离物中有重配的证据（Miranda *et al.*，2000）。同样地，TSWV 的两个分离物之间的基因组重配能克服 *N* 基因控制的转基因抗性（Qiu and Moyer，1999）。在后面这两种情形中，可能是重配的分离物面临的选择压力克服了对基因组片段间不亲和性的限制。

上述例子说明存在着植物病毒间广泛的突变和重组的证据。从 RNA→RNA 以及通过反转录复制的、复制体系中没有校正过程的植物病毒肯定会有高水平的突变。在双生病毒中的相对高水平的变异是未预想到的，但是，就如第Ⅹ节（D.7）中所述，对这种现象会有一种分子方面的解释。在靠微观进化产生新种类的时候，突变是变异的主要源泉（图 17.8）。对病毒基因组序列的分析正提供越来越多的证据表明重组是宏观进化、产生新属和新科的主要因素。

实验室中的实验显示病毒有很强的突变和重组的潜能。这一潜能在自然条件下看来不能充分表现，因此对于突变体和重组体的生存可能有许多限制。这些限制将在下面第ⅩⅢ节中讨论。

上面的例子表明，最初针对 DNA 噬菌体提出的通过重组交换模块实现宏观进化的这一理论（Botstein，1980）（第Ⅹ节 C）看来同样适用于 RNA 病毒。该理论同样适用于反转录病毒（Hull，1992；Hull and Covey，1996）。然而，如果结合上面的例子仔细考虑模块理论，则“模块”（module）的最初定义“可相互交换的遗传元件，各具有一种特定的生物学功能”有问题。在上面的例子中，有大型、有几种功能的模块，也有较小的、可能只有一种功能的模块。黄症病毒属病毒（luteoviruses）可能是从两段半基

因组（half genome）重组进化来的（图 17.13），一半含有复制酶，另一半含有其他所有的功能（如衣壳蛋白、昆虫传播因子、细胞间移动以及转录与翻译控制因子等）。与此不同的是，长线病毒属病毒（closteroviruses）通过获得影响一个或少数几个生物学功能的模块来进化，CABYV 的发生涉及了 ORF 3 + 5 通读蛋白基因 5′ 部分的交换。因此，如果要保留描述非常清楚的模块的最初定义，必须用一些术语以便描述模块的集合和模块的部分。

认识到模块交换在病毒进化中所起的重要作用就会发现两个问题。从实用的角度来讲，它表明转基因植株释放到田间可能有危险性；这在第 16 章（第Ⅶ节 E）中已讨论过。模块交换也给病毒分类带来了问题，例如，SbDV 和 ScYLV 综合了黄症病毒科两个属，甚至是 3 个属的特性。

第Ⅺ节　病毒基因的来源

前面一节的讨论说明，基于现在的理解，病毒进化的一个重要基础涉及了构成病毒基因组的功能性模块的获得和交换。在本节中，将讨论这些模块起源的一些观点。关于基因的起源有两种理论，即分子“大爆炸”（big bang）的共同起源学说和连续创造学说（Keese and Gibbs，1992）。

在连续创造条件下产生新编码序列的一种机制是套印（overprinting），即已经存在的核苷酸序列在一个不同的读框或非编码的 ORF 内从头（*de novo*）翻译。Gibbs 和 Keese（1995）讨论过套印的一些证据。TYMV 基因组就是这样一个例子（图 6.53）。最大的 ORF 编码具有 GDD 模体的复制酶。该 ORF 的 5′端也包含从基因组第一个 AUG 开始的、重叠的异读框基因（out-of-frame gene），它在复制酶 ORF 起点上游的 4 个核苷酸处。这暗示复制酶基因是最初的 ORF，重叠的基因是通过套印形成的。

A. 复制酶

1. RNA 复制酶

核心 RNA 复制酶（replicase）的结构在第 8 章（第Ⅳ节 B）中讨论过，它们包括几个功能单位：依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（RdRp）、解旋酶（helicase）和一个甲基转移酶（methyltransferase）；RdRp 和解旋酶可以归到几个超家族或超组中（表 8.1 和表 8.2）。在这些基本的活性（酶）是否分别有其共同起源、产生单源进化途径（monophyletic evolutionary pathway）还是为来自几个起源的多源进化的问题上观点不一致（Gorbalenya，1995；Zanotti *et al.*，1996）。然而，有人提出最早形式的核酸是 RNA（Cech and Bass，1986），这将会表明 RNA 复制是非常古老的。

尽管对于核心 RNA 复制酶组成成分的单源或多源起源意见迥异，但有合理的证据表明它们在现代病毒基因组中的排列是由这些组分的模块改组（modular shuffling）形成的（图 17. 17）。

2. 反转录酶

花椰菜花叶病毒科（*Caulimoviridae*）成员的复制是通过反转录酶（reverse tran-

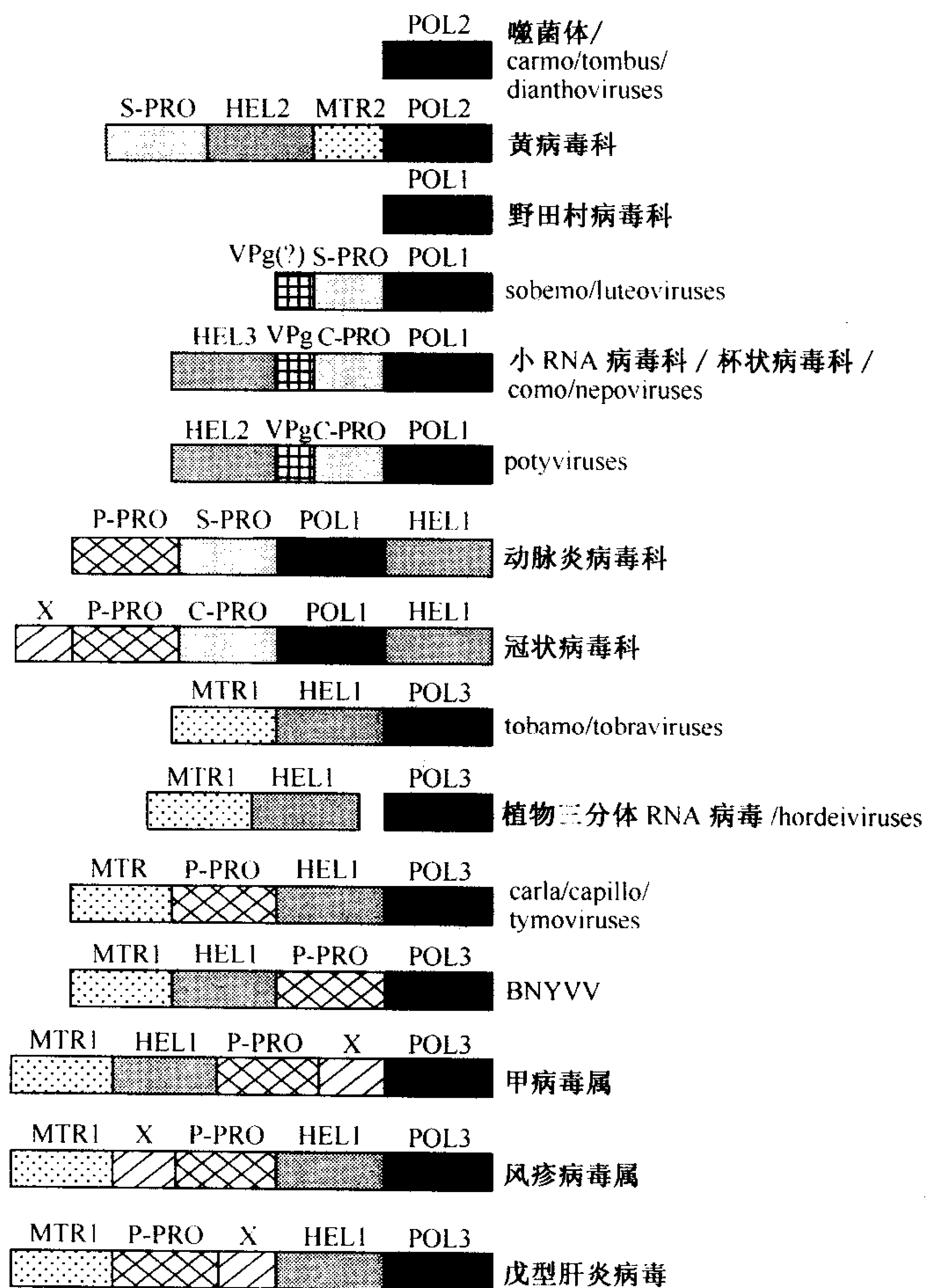


图 17.17 正单链 RNA 病毒编码参与基因组复制和表达的蛋白的主要基因（结构域）"核心"基因重排过程中的保守和变异性。不太保守结构域的缺省未在图中指出。POL1、POL2 和 POL3 分别指依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶超组 1、2 和 3。HEL1、HEL2 和 HEL3 分别指（推定的）超家族 1、2 和 3 的 RNA 解旋酶（关于超组和超家族，参见第 8 章第Ⅳ节 B)；S-Pro，类似丝氨酸胰凝乳蛋白酶的蛋白酶；C-Pro，类似半胱氨酸胰凝乳蛋白酶的蛋白酶；P-Pro，类似木瓜蛋白酶的蛋白酶；MTR1、MTR2 分别指甲基转移酶类型 1 和 2。编码病毒粒体"附属"蛋白"外壳"基因没有显示出来。框未按比例绘制。承蒙版权所有者（©CRC Press LLC）惠允，引自 Koonin 和 Dolja（1993）。

scriptase，RT）将 RNA 模板转变为 DNA（参见第 8 章第Ⅶ节 A)。有几个证据表明 RT 的基本元件是非常古老的。RNA 出现早于 DNA 的观点，以及 RdRp 和 RT 之间的序列相似性（Argos，1988；Doolittle *et al.*，1989）都说明 RT 是最早的酶之一（Cech and Bass，1989)。所有的反转录因子（retroelement）的 RT 之间的氨基酸同源性说明这种酶只进化了一次（Doolittle *et al.*，1989；Xiong and Eichbush，1990)。

3. DNA 复制酶

在第 8 章第Ⅷ节介绍过双生病毒和矮缩病毒科病毒（nanoviruses）的 DNA→DNA

的复制。这些病毒利用寄主的DNA复制酶功能，当它们在已分化的细胞中复制的时候，必须改变细胞的周期。因此，病毒基因的功能之一是与指导细胞进入S期的成视网膜细胞瘤（retinoblastoma，Rb）蛋白相结合。Rb结合蛋白的基因很可能是病毒从其寄主中获得的。

B. 蛋白酶

在植物病毒中发现了3种类型的病毒编码的蛋白酶（proteinase）（表7.2）。这些蛋白酶的功能是通过与植物和动物蛋白质的氨基酸序列加以比较而鉴定出来的，所以出现了"类胰凝乳蛋白酶"（chymotrypsin-like）和"类木瓜蛋白酶"（papain-like）等术语。这会让人想到它们最初起源于其寄主。在大多数情况下，蛋白酶（protease）是一种独特的基因产物，但有时与其他功能联系在一起，如马铃薯Y病毒属病毒的HC-Pro还是昆虫传播辅助因子以及寄主基因沉默的抑制因子（suppressor）。现在还不清楚这表明了最初的蛋白酶是多功能的，还是蛋白酶分子后来获得了各种功能模块。

C. 衣壳蛋白

病毒粒体的结构是由衣壳蛋白亚基的结构决定的（参见第5章）。因为包装的需要，组成杆状粒子的蛋白质只能是楔形的（wedge-shaped），组成球状粒子的蛋白亚基只能是圆锥形的（conical）或三维的楔形。这些蛋白质的形状是由其多肽链的二级和三级结构决定的。大多数（如果不是全部）具有等轴对称粒体的病毒的衣壳蛋白都有一个由8个反平行的（antiparallel）β折叠（称作β桶或胶冻卷模体）组成的基本结构（参见第5章第Ⅵ节）（图5.19）。Chelvanayagam等（1992）比较了25个等轴病毒的衣壳蛋白结构，认为最好将该结构视为两片楔而非一个桶。他们提出了一种从形成$T=1$粒子的亚基到那些能够形成$T=3$和更高级粒子的进化途径（参见第5章第Ⅴ节关于等轴对称病毒结构的描述）。该进化涉及了为适应邻近蛋白亚基之间准等价互作的、围绕基本β桶的蛋白环结构的改变。这些考虑可能表明等轴病毒衣壳蛋白的单一起源。然而，辛德比斯病毒（*Sindbis virus*）的衣壳蛋白与胰凝乳蛋白酶类有密切关系（Choi *et al.*，1991），这说明它可能有独立的起源。

出于结构方面的考虑，McLachlan等（1980）认为TMV的衣壳蛋白最初是两个较小单位的二聚体。可能先有一个串联基因重复事件，然后是从点突变而引起的氨基酸序列的漂变，最后产生现在的衣壳蛋白亚基。Gorbalenya等（1986）已经借助广泛的基因重复来解释脊髓灰质炎病毒（poliovirus）多聚蛋白内部重复的同源性。他们还认为其基因组的VPg是由编码11肽的基因经过多步扩增，然后是单个拷贝的趋异而形成的。现在包含22个氨基酸的VPg可能起源于原始基因的二聚体。

D. 细胞间移动蛋白

许多病毒的细胞间移动是由一个或多个移动蛋白（MP）介导的（参见第9章第Ⅱ节D.2）。至少这些蛋白质中的一种类型——包括TMV MP的"30K超家族"可以打开胞间连丝的大门，让病毒侵染单位通过，以便进入未受侵染的细胞。正如第9章（第Ⅱ节L）所述，像KNOTTED1同源（域）蛋白质（homeodomain protein）（Lucas *et*

al.，1995）这样的植物蛋白质可以选择性地通过胞间连丝，而且在植物中已发现了类似 TMV CP 的侧向同源物（paralog）（Xoconostle-Cázares *et al.*，1999）。因此，很可能这个功能模块是病毒从植物基因组中获得的。因为有不同的方式影响细胞间的移动，不同的基因可能被不同的病毒所获得。例如，三基因块（triple gene block）可能是 3 个不同基因的组合。

E. 基因沉默的抑制因子

在第 10 章第Ⅳ节介绍过植物（和其他生物）抵御"外源"核酸的转录后基因沉默（PTGS）防卫系统。至少某些病毒含有抑制这一防卫系统的基因（如马铃薯 Y 病毒属病毒的 HC-Pro 和黄瓜花叶病毒属病毒的 *2b* 基因）。这些抑制基因的起源还不清楚，但有一种可能是它们来自于植物基因组。植物必须忍受"外源"核酸的时间段是在受精过程中。参与受精过程的蛋白质可能是病毒抑制 PTGS 基因的来源。

第Ⅻ节　病毒、类病毒和卫星的起源

关于高等生物起源和进化途径的许多证据来自于宏观（和微观）残留物的化石记录。如上所述，尽管琥珀中的昆虫和从考古地点发现的种子中可能会有病毒的某些证据，病毒并不形成传统的化石。进化数据的另一个来源是被称作"分子化石"（molecular fossils）的东西。通过比较分析高等生物甚至细菌和真菌的核酸和蛋白质可以得到许多关于其亲缘关系，甚至是进化途径的信息。病毒基因组的周转率（turnover rate）高，加之其发生较大变异的潜力，似乎难以得到关于病毒进化的信息源。然而，大多数最基本的功能由高度保守的必需序列控制，如酶催化位点；在这些模体中的显著变异对该生物而言可能是致死性的。这些模体在病毒中是保守的，成为获得病毒进化甚至起源的重要信息源。

A. 病毒的起源

关于病毒的起源有很多假说。在本书前一版本发行期间，主要有 3 种假说：

（1）病毒来源于原始的细胞前生命形式（precellular life form）。这一假说是基于最早的前生命多聚体（prebiotic polymer）是 RNA 这样的观点，它们具有酶促活性，就像核酶（ribozyme）一样（参见第 14 章第Ⅰ节 C. 3. b）。这些前生物 RNA 后来寄生了最早的细胞。

（2）病毒从细胞的正常成分发展而来。这种假说认为，病毒起源于逃脱正常控制机制的某些细胞成分（cell constituent），变成了自我复制的实体。正常细胞成分包括转座元件（transposable element）和 mRNA。

（3）病毒起源于最终寄生了正常细胞的退化细胞（degenerate cell）。

从前面几节的讨论可以看出，病毒进化大多通过功能模块的获得和交换而发生。最基本的模块是复制子（replicon）（即能够复制病毒基因组的最小单元），随后附加了使病毒占据其"生态位"（niche）的其他模块。基本复制子的来源可能会因基因组类型的不同而异。反转录类的病毒（reverse-transcribing virus）可能起源于类似反转录因子的

序列（retroelement-like sequence），后来获得了其他模块使其可进行水平传播。然而，反转录因子也有可能是失去了水平传播基因的退化病毒（degenerate virus）。

RNA病毒基本复制子的来源更难以推测，这一模块可能来源于上面的（1）或（2）。如Schuster和Stadler（1999）所述，早期复制子的发展涉及了从简单化学反应体系到能够形成自我组织复制体系的自动催化过程的转变。

DNA病毒如双生病毒（geminiviruses）和矮缩病毒科病毒（nanoviruses）可能来源于类似质粒的DNA分子。前一节中已经讨论过“适应生态位的”（niche-adapting）模块的可能起源和来源。

虽然像痘病毒（poxvirus）那样的大型动物病毒可能起源于退化的细胞（Fenner，1979），但任何植物病毒都不可能起源于退化的细胞。

1. 原核生物和真核生物的病毒

侵染原核生物的病毒和侵染真核生物的病毒之间有根本的区别吗？到现在为止还没有明确的例证证明侵染一种类型生物的病毒能在另外一种类型的生物细胞中完成其侵染循环。有一些报道认为在原核生物病毒和各种真核生物病毒之间很短的一段序列有相似性。噬菌体MS2的依赖于RNA的RNA聚合酶（RdRp）上有Asp-Asp序列（Kamer and Argos，1984），这也是侵染真核生物的病毒中保守的模体的一部分（参见第8章第Ⅳ节B.1）。Rogers等（1986）注意到了不同的双生病毒DNA的共同区（common region）中茎环结构（stem and loop structure）的核苷酸序列和大肠杆菌噬菌体（coliphage）ΦX174基因A蛋白的识别和切割位点的一段核苷酸序列有相似性，因此提出它们的DNA复制可能有相同的机制（参见第8章第Ⅷ节C）。另外一个观察结果可能与此也有关系。现在已经知道叶绿体是从原核细胞进化来的。AbMV的ssDNA存在于受侵染苘麻的叶绿体内（Gröning *et al.*，1987）。然而，现有的证据表明，侵染原核生物的病毒和大多数侵染真核生物的病毒可能有独立的进化起源，或者，即便曾经有共同的祖先病毒，那也是在非常遥远的过去。

2. 侵染被子植物以下光合真核生物的病毒

在属于绿藻纲（Chlorophyceae）、红藻纲（Rhodophyceae）和褐藻纲（Phaeophyceae）的许多真核藻类植物的超薄切片中发现了类似病毒的粒子（virus-like particle，VLP）。在第2章第Ⅵ节A中对此做过介绍。一般有两种类型的病毒：具有双链DNA基因组、大多数像噬菌体的等轴对称病毒和具有RNA基因组的杆状病毒。来自真核藻类南方轮藻（*Chara australis*）的杆状病毒（CAV）具有类似烟草花叶病毒属病毒的一些特征。然而，它的基因组要大得多（11 kb，而不是TMV的6.4 kb），其中大约7 kb基因组的序列已经测定，揭示了其他的亲缘关系（A. J. Gibbs，Matthews，1991）：①CAV的衣壳蛋白组成和BNYVV非常接近，而且与TRV的关系比与TMV的关系更密切；②CAV的GDD聚合酶模体与BNYVV的聚合酶关系最密切；③CAV中发现的两个GKT核苷酸结合模体排列方式与马铃薯X病毒属病毒非常相似。因此，CAV似乎同时具有侵染被子植物的几个组群的杆状病毒的基因组组构和序列特征。它似乎与真菌传杆状病毒属（*Furovirus*）的亲和性最强，但迄今尚未发现其被子植物寄

主。鉴于这些原因，CAV 最不可能是近来才转移到轮藻属（*Chara*）的、来源于一个被子植物寄主上的杆状病毒。在形态学上，轮藻属（*Chara*）是轮藻纲（Charophyceae）最复杂的类型之一，有着悠久的地质历史，是研究最为深入的一个组（Round，1984）。基于细胞学和化学上的类似性，陆地植物（有胚植物，embryophyte）可能是从轮藻纲绿藻进化而来的。轮藻纲中另一个更复杂的类型，鞘毛藻科（Coleochaete），含有绿藻中没有的物质——木质素（Delwiche *et al.*，1989）。分子遗传学证据表明陆生植物起源于轮藻纲。在所有研究过的陆生植物叶绿体 DNA 中的 $tRNA^{ala}$ 和 $tRNA^{ile}$ 基因中都发现了第二组内含子（group Ⅱ intron）。所有研究过的藻类和真细菌（eubacteria）都有不间断的基因，但是 Manhart 和 Palmer（1990）证明在轮藻纲（Charophyceae）的 3 个成员中存在的内含子同地钱属（*Marchantia*）中的排列一样，有力地支持了它们与形成陆地植物的谱系相关的观点。树形图说明轮藻纲可能在 4 亿～5 亿年前已经获得了内含子。因此，轮藻属中的病毒可能是侵染（属于或接近最终形成被子植物谱系的）植物的、有记录的最古老的病毒。

迄今尚没有从苔藓植物（bryophyte）中发现病毒的报道。在对开蕨（*Phyllitis scolopendrium*）中发现了一种病毒粒体像烟草脆裂病毒属病毒（参见第 2 章第Ⅵ节 C）。裸子植物（gymnosperm）中也发现了一些病毒（参见第 2 章第Ⅵ节 D），一种侵染苏铁（*Cycas revoluta*）的病毒与线虫传多面体病毒属病毒（nepoviruses）相似。

总而言之，侵染轮藻属的正单链 RNA 病毒的存在说明这一类型的病毒有古老的起源。除了这个例子之外，有关侵染被子植物以下的光合真核生物的病毒信息的缺乏使我们对植物病毒进化的时代和过程知之甚少。苏铁科植物（cycad）被视为活化石（living fossil），自中世代早期（early Mesozoic times）就有记录。然而，在苏铁（*C. revoluta*）中发现的线虫传多面体病毒属病毒非常可能起源于一种现代的被子植物，因为它易于侵染藜属植物（*Chenopodium* spp.）。侵染一种类似小球藻的藻类的藻 DNA 病毒（phycodnavirus）PBCV-1 更可能有古老的起源。然而，从结构来看，它们不像是原始的病毒。它们比任何已知的侵染被子植物的病毒都更大、更复杂，其基因组长约 300 kb，至少含有 50 种结构蛋白（Meints *et al.*，1986）。

B. 类病毒的起源

就类病毒（viroid）的进化而言，记住其变异易于被相当小的序列改变所破坏是非常重要的（Diener，1996；Semancik and Duran-Vila，1999）（参见第 14 章第Ⅰ节 E. 2）。然而，对一系列密切相关的类病毒进行的序列比较明确表明，单碱基改变、插入和缺失在类病毒进化中起着一定作用。正如第 14 章（第Ⅰ节 D. 6）中所讨论的，大家更为关心的问题是分子间重排在类病毒的进化中发挥作用的证据。

1. 可能来源于其他核酸

a. 来源于小型核 RNA

小型核 RNA（small nuclear RNA，snRNA）在加工断裂基因（split gene）初级转录产物的过程中起作用，从而实现精确排列和内含子的正确切除。已经证明一些 snRNA（如 U1）与内含子的末端有碱基互补性。Kiss 等（1983）发现在 PSTVd RNA

和 Novikoff 肝瘤（hepatoma）细胞的 U3B snRNA 之间有显著的序列相似性，说明类病毒可能与 snRNA 有关。

b. 来源于内含子

第一组内含子（group Ⅰ intron）广泛分布于线粒体 mRNA 和 tRNA 基因、叶绿体 tRNA 基因和核 tRNA 基因中。它们都有高度保守的含 16 个核苷酸的序列和三套互补序列。已经在几个第一组内含子中发现了自剪接（self-splicing）现象。

Diener（1981）注意到在 PSTVd 负链 RNA 和哺乳动物 U1 snRNA 的 5′端核苷酸之间存在着一个高度互补的 23 nt 的区段（Filipowicz and Kiss，1993）。在此基础上，他认为类病毒可能起源于逃逸的内含子。Dinter-Gottlieb（1986）指出类病毒包含一个共有序列（consensus sequence）和三套互补碱基。除此之外，在类病毒和来自四膜虫（*Tetrahymena*）的一个自剪接的内含子之间有几处序列类似。她证实在一种类病毒内的互补序列的配对能产生类似四膜虫中可自剪接的第一组内含子的结构。这是一个比最大程度碱基配对的类病毒更开放的结构，可能通过蛋白结合而保持稳定性。Hadidi（1986）比较了类病毒、其他 RNA 病原、内含子和外显子之间的序列相似性。随着比较的统计严谨性的增加，只有内含子和类病毒之间的相似性保持在显著水平。

逃逸的内含子概念包括 RNA 自加工（self-processing）的观点。然而，现在关于类病毒的证据不适合这一个模型。ASBV 能够自切割（参见第 14 章第Ⅰ节 D），但该类病毒不含有以前观察到的、其他类病毒中存在的类似内含子的序列模体。Tsagris 等（1987b）利用 PSTVd 和相关的类病毒证明这种自动催化加工（autocatalytic processing）不能像内含子那样可在体外进行。在所有关于 snRNA 或内含子和类病毒之间相互关系的讨论中，都假定迟早会发现序列与动物体系中相似的植物 snRNA。此外，还假定类病毒起源于寄主元件，而忽视了寄主元件是被“捕获”的类病毒这种可能性。

c. 来源于假设的信号 RNA

Zimmern（1982）提出细胞间的某些控制元件（control element）可能由小型可移动的 RNA（mobile RNA）组成，并且类病毒可能起源于这些控制元件。

d. 来源于转座遗传因子

对一组类病毒的序列分析表明它们与某些转座遗传元件（包括反转录病毒的原病毒）有惊人的相似性（Kiefer *et al.*，1983）。这些相似性包括通常以二核苷酸（dinucleotide）U-G 和 C-A 和侧翼不完全同向重复（flanking imperfect direct repeat）结束。Kiefer 等认为类病毒可能起源于转座因子（transposable element）或反转录病毒内部核苷酸序列的缺失。ASBVd 的序列不适合该模型。

e. 来源于线粒体质粒

有人曾将类病毒和来自真菌——脉胞霉（*Neurospora* spp.）的某些线粒体质粒加以类比（Diener，1996）。虽然 Mauriceville 和 Varkud 质粒由小型环状 DNA 分子构成，它们的 RNA 转录物中含有第一组内含子特征的保守序列。Varkud 小质粒包括线状和环状 ssRNA，线状形式是由“类似类病毒的、RNA 催化的（留下了 5′-OH 和 2′，3′-环磷酸末端）切割反应所产生的”（Lambowitz and Belford，1993）。

f. 来源于卫星 RNA

虽然类病毒和类病毒样的卫星 RNA（viroid-like satellite RNA）间几乎没有序列相

似性，但它们具有几个共同的特性：分子小、环状单链 RNA 以及缺少 mRNA 活性。此外，有些卫星 RNA 通过滚环模式（rolling circle model）产生比单位长度（unit-length）长的 RNA 进行复制。另一方面，类病毒在细胞核中复制，而类病毒样的卫星在细胞质中复制。然而，Francki 等（1986 b）证明 PSTVd 在体内可以包装到 VTMoV 的粒子内。番茄植株对该病毒是免疫的，当用含有类病毒的这种病毒接种后植株受到了 PSTVd 的侵染。从理论上讲，类病毒样的卫星如果变得能够独立于辅助病毒而复制就有可能变成一种类病毒。

如第 14 章（第Ⅱ节 B. 2. a）中所述，花生矮化病毒的卫星（PARNA5）与各种类病毒有几处高度相似的区域，包括大多数类病毒的中央保守区（conserved central region）。然而，PARNA5 的复制似乎像其辅助病毒 RNA 而不像类病毒样卫星 RNA。PARNA5 中也有保守的内含子序列（Collmer *et al.*，1985）。

2. 类病毒作为前生物进化的活化石

许多作者（Cech and Bass，1986）认为在前生物进化（pre-biotic evolution）中 RNA 的出现早于 DNA。具有剪接和聚合酶活性 RNA 分子的发现导致了 RNA 催化的 RNA 复制模型的提出（Cech，1986）。因此，鉴于类病毒为小分子、环状构像、内在稳定性、RNA→RNA 的复制循环并且缺少蛋白编码能力，现代的类病毒可能起源于 DNA 进化之前的一种类型的 RNA 分子。Diener（1989；1996）曾对此观点进行过讨论。

3. 类病毒和类病毒样卫星的起源和进化

Semancik 和 Duran-Vila（1999）提出了一个反映类病毒起源和进化的当前观点的模型（图 17. 18）。

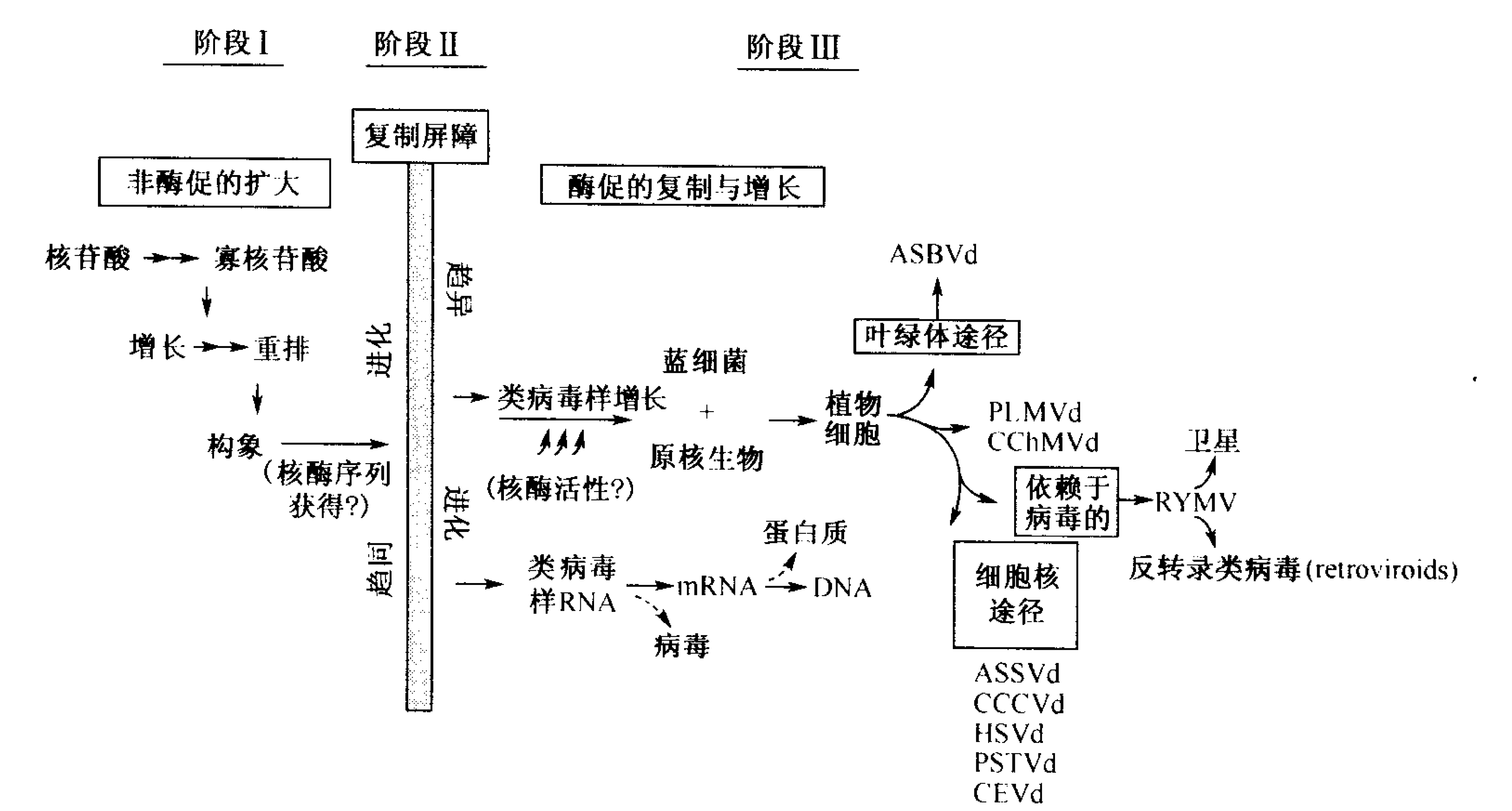


图 17. 18　类病毒和类病毒样分子的进化模型及其与病毒和其他核酸种类的关系。经允许，引自 Semancik 和 Duran Vila（1999）。

C. 卫星病毒和卫星核酸的起源

1. 卫星病毒

除了依赖于辅助病毒和个体小之外，卫星病毒应该属于和其他病毒一样的病原范畴。有人已经采用了这个观点，认为它们很可能起源于独立的病毒，由于在与另一（辅助）病毒的复合侵染中出现功能的退化性损失而成为卫星病毒（Francki，1985）。

2. 卫星 RNA

如第 14 章（第Ⅱ节 B. 4）所述，基于其复制机制，大多数卫星 RNA 属于两组中的一组。第一组以 CMV 和 TBRV 的卫星 RNA 为代表，有类似其辅助病毒 RNA 的末端结构，通过单位长度的负链模板进行复制，依赖于辅助病毒的复制酶，看来可编码1～3个蛋白质。第二组以 sTRSV 为代表，看来没有 mRNA 功能，通过与类病毒类似的滚环机制进行复制。类病毒样卫星 RNA 的预测的二级结构与类病毒的杆状构象非常相似，但除了在各组病原的某些成员间保守的 GAAAC 外它们之间很少有序列同源性（Keese and Symons，1987）。

因此，卫星 RNA 可能来源于至少 3 个不同的谱系（图 17. 19）。前面提到过病毒和类病毒的起源。以类似病毒的方式复制的卫星在 3′端与辅助病毒有相似性；这对辅助病毒的复制机构（replication machinery）的识别是必需的。因此，这样的卫星可以通过涉及辅助病毒的 3′端区与寄主序列重组的第三条途径产生。缺少对寄主序列的选择压力会使它发生趋异进化，这样，卫星起源于寄主的特征就不再明显。从进化的观点来看 TCV 的卫星 RNA C（图 14. 14）特别有意义。它的结构似乎表明一个起源未知的 RNA 和辅助病毒基因组间可以发生重组，产生有不同生物学特性的新卫星。

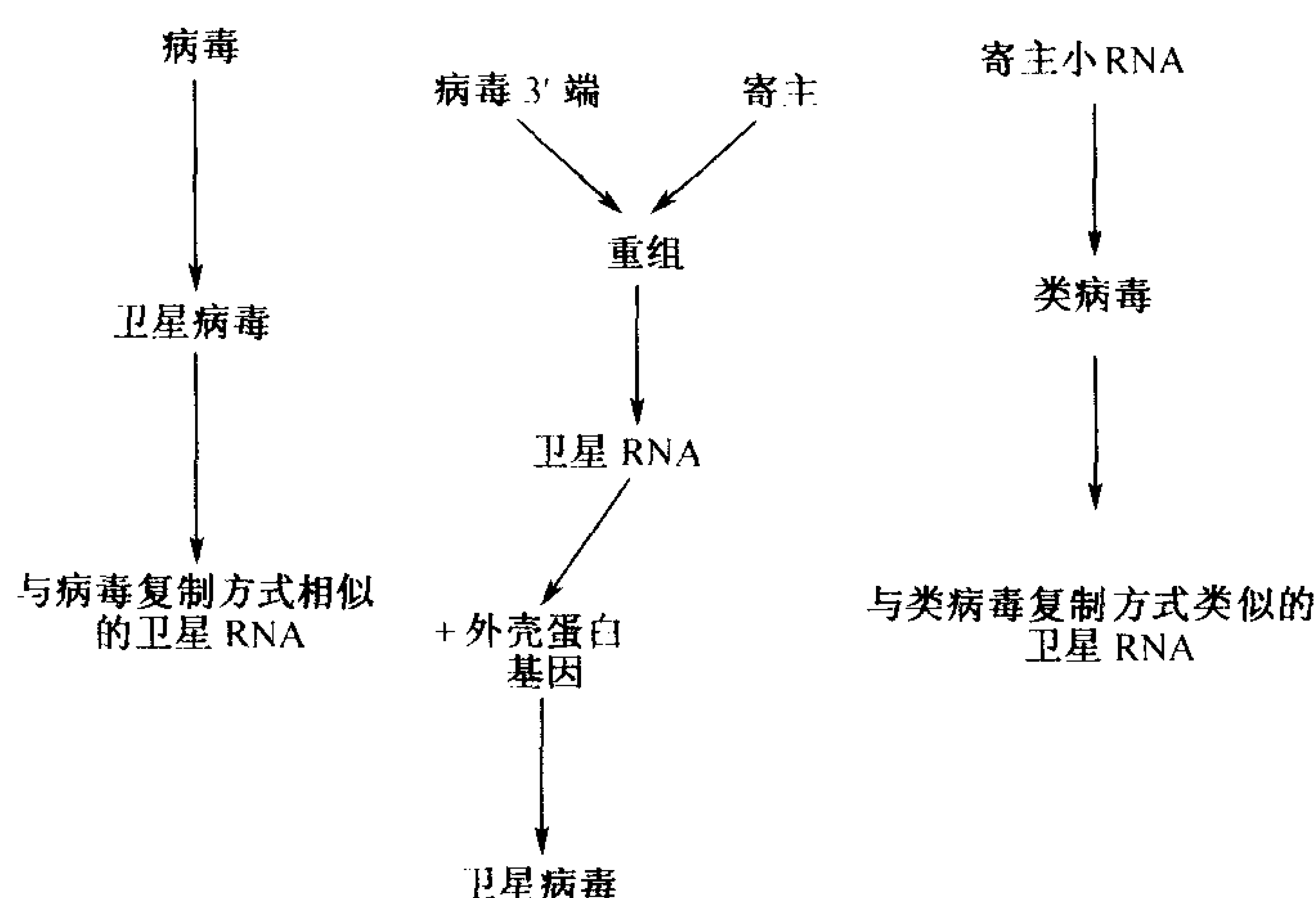


图 17. 19　卫星 RNA 衍生过程的假设模式

像病毒一样，卫星也可以通过突变和重组发生变异。通过分析 1989、1990 和 1991 年从田间的感病番茄植株上分离到的 17 个 CMV 卫星 RNA 变株的核苷酸序列，Aranda 等（1997）认为重组对产生新的变株起着重要的作用。

第Ⅷ节　进化的选择压力

像其他生物体一样，病毒进化亦受到选择压力对内在变异影响的推动。关于病毒的许多分子信息来自于实验室实验，虽然有助于了解有关的机制，但不能提供在“自然状态”下所发生事件的信息全貌。在本节中，将讨论可促进和限制植物病毒进化的一些因素。

A. 使变异最大化

在上面几节中，介绍过（提供材料供选择压力发挥作用的）变异、突变、假重组和重组的根源。病毒的迅速复制和缺少校正或修复机制给 RNA 和 DNA 病毒提供了突变性变异的潜力。因此，选择压力在包括一个优势序列和许多次要变株序列的准种水平上起作用。就像 Padidam 等（1999）所指出的，3 个因素促成了导致产生新病毒的重组，即复合侵染、高水平的病毒复制和介体寄主范围的扩大。

B. 控制变异

1. 控制变异的因素

病毒要生存就必须控制这种变异的泛滥，原因如下：

（1）对复制是致死性的变株必须除去。在一个准种群体中这样的变株可能会被其他的变株互补，但看来这种情况是不常见的。

（2）降低病毒群体适合度的变株必须除去。当病毒通过一个如限制病毒数量的传播途径那样的瓶颈时，Muller 棘轮会造成适合度的损失（参见第Ⅴ节 A）。从植物病毒取得的成功来看，很明显它们能克服这一限制，尽管我们不知道大多数病毒是如何克服的。

（3）病毒基因组包装在核蛋白粒子内以便在寄主间传播，其中可能存在包装的限制。许多病毒的包装依赖于核酸和衣壳蛋白亚基的直接互作，而碱基改变会影响这种互作。核酸的二级和三级结构对于包装非常重要，杆状病毒对二级结构几乎没有要求，但等轴对称的病毒要求高度结构化的核酸。此外，要形成稳定的等轴粒子对包装（衣壳化）的核酸数量也有物理限制。其中一个这方面的例子就是雀麦花叶病毒属病毒，它们有 3 种核蛋白组分，一种包被 RNA 1（大约 3.3 kb），一种包被 RNA 2（大约 3.0 kb），第三种包被 RNA 3＋ RNA 4[（2.1＋1.0） kb]；因此，每个粒子大约包含 3 kb 的 RNA。

（4）病毒的增殖和生存完全依赖于它们的寄主。因此，任何明显损害寄主的病毒变株将会被淘汰掉。然而，一个变株如果通过重组改变了寄主范围则可能是有利的。

（5）病毒的表达依赖于寄主机构的各种部分。因此，突变可能把一个 ORF 上的密码子选择（使用）（codon usage）从原本在寄主中有利的变成不利的。如第 7 章（第Ⅲ节 B. 2. g）所述，一种病毒的密码子选择不一定是该寄主 mRNA 中最为普遍的那一种。

（6）病毒以特定方式从罹病寄主传播到健康寄主，通常是通过与病毒有专化性互作

的昆虫介体。任何降低传播效率的变株都不会被选择。然而，如同寄主范围一样，一个改变了传播介体的变株可能是有利的。

2. 接近变化极限的蛋白质

当有共同进化起源的两种蛋白质趋异分化时，它们可能会达到一种对变化的限制，保留着多于随机序列应有的共同氨基酸的数目（位置）。这种对变化的限制可能是由于蛋白质功能上的需要。当达到这一极限时，趋同（convergence）即回复突变（back mutation）与平行突变（parallel mutation）会和趋异突变一样频繁。如果两个趋异的蛋白质接近和保持这一稳态条件（steady-state condition）时，序列差异不再反映进化距离，因此不应将这样的序列放到进化树中。一些细菌的氨基酸序列数据就属于这一类（Meyer *et al.*，1986）。某些组群的植物病毒的衣壳蛋白可能也已经达到了这种状态（如烟草花叶病毒属病毒）。这种对变化的限制即使在一种蛋白质里可能也会有差异。因此，一些植物病毒衣壳蛋白的表面结构域（surface domain）比具有结构作用的结构域变异更大（受限制更少）。蛋白质的三维结构在较长的进化时期内比一级结构更为保守。因此，它们对于在氨基酸序列明显趋异很久以后的进化比较可能更有帮助。Rossmann 和 Rueckert（1987）指出，到那时为止所有已经测试过的二十面体病毒的蛋白质都有一个 8 链的 β 桶作为它们的核心。相反，TMV 和其他杆状病毒均以 4 个 α 螺旋组成的束（bundle）作为其核心。这导致了下述观点的形成：所有的二十面体病毒衣壳蛋白都有一个共同的起源，而所有杆状病毒的衣壳蛋白具有另外一个共同起源。在不存在显著的氨基酸序列相似性时，另外的一个解释是发生了趋同进化。或许一种具有二十面体对称的病毒的功能性衣壳蛋白需要一个 β 桶核心；同样地，杆状病毒有功能的衣壳蛋白也需要以 α 螺旋为核心。

3. 选择压力的作用

有功能的病毒基因只有对病毒的生存有用时才会被保留。例如，只在营养繁殖的植物寄主中保持 WTV 时会导致病毒在叶蝉内的复制和传播能力的丧失。这种功能的丧失是由于某些基因组片段的缺失（图 17.20）。同样地，BNYVV 的RNA 3和RNA 4在不需要通过真菌介体传播时也会发生缺失（参见第 14 章第Ⅱ节 B. 3. c）。类病毒的点突变株（point mutant）回复到野生型是另外一个选择压力作用的例子（Owens *et al.*，1986）。

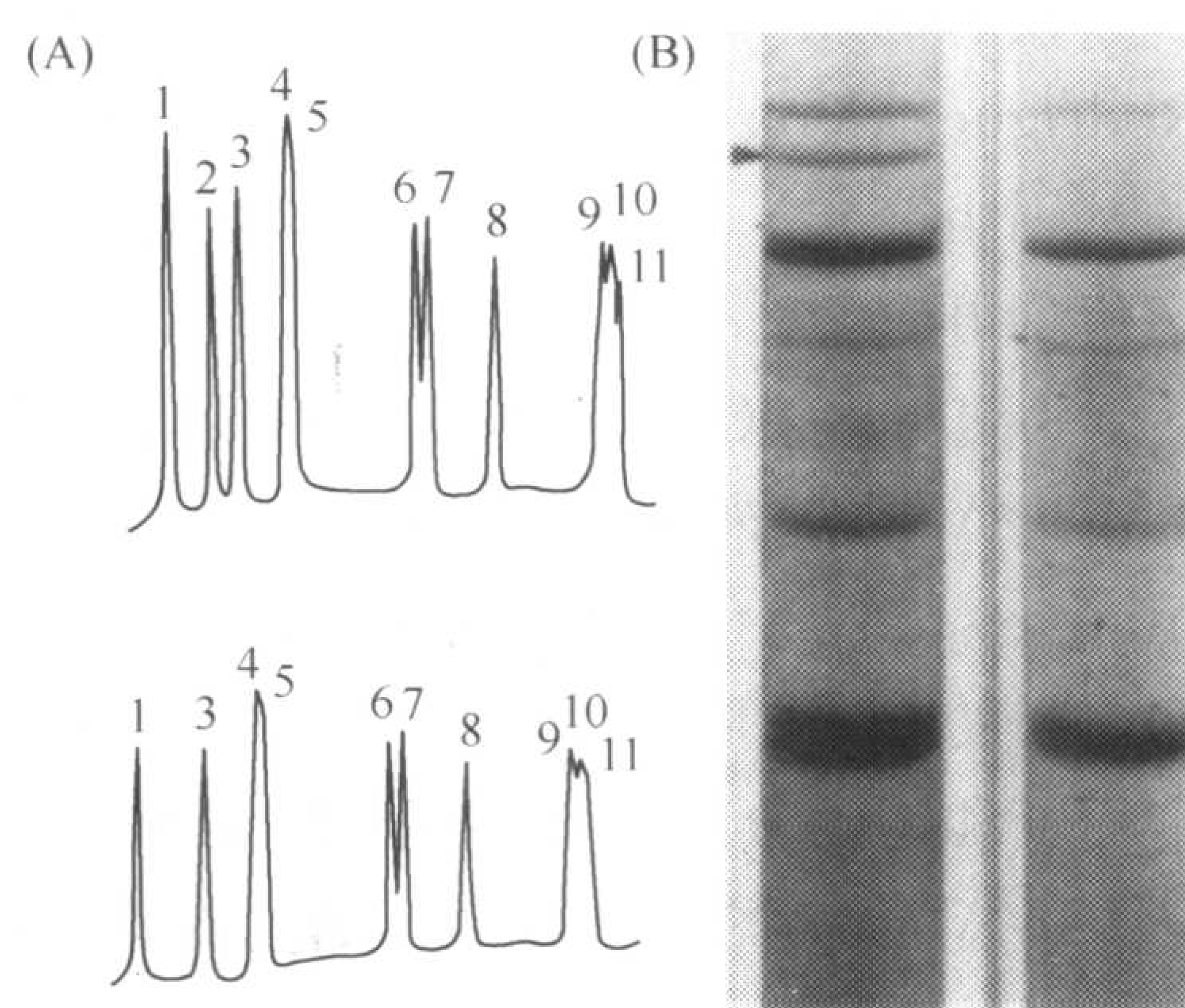


图 17.20 野生型 WTV 和一个已经失去经叶蝉传播能力的突变株的基因组。（A）dsRNA 基因组片段经凝胶电泳分离后的扫描图（RNA 12 没有显示出来）。上图为野生型病毒的扫描图。在突变体中（下图），RNA 2 丢失。（B）左边是野生型病毒的多肽。右泳道中，突变体丢失了一条多肽。因此这条多肽是由 RNA 2 编码的，它参与叶蝉传毒（参见正文）。经允许，引自 Reddy 和 Black（1977）。

4. 来自寄主植物的选择压力

给定的寄主种或品种体内的条件将会对入侵病毒的急剧变化施加压力。病毒的

基因组和基因产物在病毒复制和移动期间必须以高度转化的方式与寄主大分子互作。这些寄主分子变化的速率比病毒潜在的变化速率慢，因此是病毒进化的“制动器”。Koonin 和 Gorbalenya（1989）根据这个普遍的观点提出 RNA 病毒蛋白以和寄主蛋白相同的氨基酸替代速率进化。然而，Sala 和 Wain-Hobson（2000）认为病毒的进化比其寄主更为保守一些。他们认为这是由于缺少校正功能而施加于 RNA 病毒基因组长度的大小限制。

一个实验系统中的选择压力可以用 Aldaoud 等（1989）的工作来说明。他们研究了一个从 cDNA 克隆的体外转录物得到的 TMV 种群中变株的进化情况。其中测量的一个标记是在毛叶烟（*Nicotiana sylvestris*）上引起坏死斑（nl）的能力。nl 变株在烟草、番茄、龙葵（*Solanum nigrum*）和碧冬茄（*Petunia hybrida*）中的比例相似。然而，洋酸浆（*Physalis floridiana*）对 nl 变株有很强的选择压力，该变株减少到几乎检测不出的水平。但是，在所有供试的寄主中，在单个植株上 nl 变株的比例有大量明显的随机变化，说明病毒种群在数天的时间段内能够迅速进化。也许一个株系群体的这些变异在侵染新的寄主种类的早期阶段发生。经过一段时间的多次转接，种群可能会趋于稳定。有一个事实支持这个观点：W. M. Stanley 提供的 TMV 分别于美国和德国在烟草品种中历经几十年独立地进行继代培养（subculture）许多次后，两个国家的病毒仍然具有同样的衣壳蛋白氨基酸序列（Zaitlin and Israel，1975）。

Rodriguez-Cerezo 和 García-Arenal（1989）用 TMGMV（以前称为 TMV U5）在其系统寄主三生烟（Samsun tobacco）上的试验为一个优势株系在单一寄主上的稳定性提供了进一步的证据。他们通过单斑分离将病毒在珊西烟（Xanthi-nc tobacco）上转接两次，然后在三生烟上经过 4 个系列的 20 次（4×20）转接后研究分离物的异质性。基因组 RNA 群体的 T1 指纹图谱鉴定未发现可检测到的任何变异。

仅有的几个田间调查支持一种观点，即特定的寄主种类趋向于稳定一个病毒种群。Rodriguez-Cerezo 等（1989）研究了 1983～1987 年从辣椒上分离到的 PMMoV 分离物的基因组变异。他们的结论是该病毒种群高度稳定，尽管变株不断从中产生，但未取代亲代种群。

Rodriguez-Cerezo 等用西班牙南部和澳大利亚光叶烟（*Nicotiana glauca*）上 TMGMV 的变株进行了野生条件下一种病毒在自然寄主上变异情况的定量研究（quantitative study）（Rodriguez-Cerezo *et al.*，1990）。他们的两个主要结论是：①不同分离物之间的 RNA 序列趋异程度较低，不管它们分离的地点相差多远；②序列相关性的紧密程度和用于分离病毒的植物在地理上的接近程度没有关系。这一结果很难解释，因为 TMGMV 已知的唯一自然传播方式就是植株间的接触。

C. 对生态位的适应

如果要与高等生物进化以适应特定的生态位（niche）来进行类比，我们应该考虑什么是病毒的生态系统（ecosystem）和生态位。Hull 和 Covey（1996）区分了两种水平参与不同适应形式的病毒生态位。“主要”水平是病毒侵染的寄主类型。因此，在进行细胞间移动时，侵染动物的病毒与侵染植物的病毒需要不同的基因（模块）。病毒需要活细胞才能生存，因而活细胞可以看作是生态系统。因此，在“微调”（fine-tuning）水平上细胞内有可以被看作是“生态位”的位点。像细胞核和质体（plastid）这样的细

胞器是明显的生态位。然而，如第13章所述，病毒在细胞内的许多功能，如复制和细胞间移动都是与特异性的细胞膜联系在一起的。因此，我们也可以把具体的细胞膜或细胞组分看作是一个细胞内病毒可以适应的生态位。

D. 进化的速率

1. 进化的非恒定速率

分子钟（molecular clock）假说认为，在一定的进化时间内序列的变化以恒定的速率进行，这已经经常用于解释“进化树”。但是，通过比较脊椎动物（Vawter and Brown，1986）和植物（Wolfe *et al.*，1987）的细胞器DNA发现在细胞核、线粒体和叶绿体DNA之间的分子钟有极大的速率差异。现在知道不同基因和谱系的变化速率差异很大（Li *et al.*，1987）。泛蛋白（遍在蛋白）（ubiquitin）是高度保守蛋白质的一个例子。它由76个氨基酸组成，在动物、高等植物和酵母之间只有3个氨基酸的替换（Dunigan *et al.*，1988）。相反，在啮齿类动物丝氨酸蛋白酶抑制剂反应中心区域的进化非常快（Hill and Hastie，1987）。珠蛋白（globin）基因的分子系统发育在这方面特别有启发性，因为已经知道数百个珠蛋白链的氨基酸序列（Goodman *et al.*，1987）。此外，在一个基因家族内密切相关的成员间分子钟行走的速率也不同（Gibbs *et al.*，1998）。病毒基因组编码的不同蛋白质，或蛋白质的不同部分也可能以不同的速率进化，对这一点几乎没有疑问。此外，基因组的一些非编码序列可能是高度保守的，特别是那些基因组复制必需的识别序列。因此，对于分子钟的应用和适用性有很多疑问（Ayala，1999）。有人已经得出结论认为“分子进化依赖于自然选择的易变过程”（fickle process），但它是一个依赖于时间的进程，经验数据（empirical data）的积累通常能给出近似的钟（Ayala，1999）。

2. 进化的估计速率

RNA病毒发生点突变的比率大约在每轮循环每个碱基10^{-3}～10^{-4}，不同病毒间有一定的差异（Holland *et al.*，1982）。而DNA聚合酶的相应估计值为10^{-11}（图8.29）。然而，Smith和Inglis（1987）已经对真核病毒DNA合成的出错率显著低于RNA病毒这一观点提出质疑。同时，如第Ⅴ节D.7部分所述，双生病毒变异的速率比预期值大得多。在理论上讲，测定的突变率表明RNA或DNA病毒基因组可以发生非常快速的改变。

病毒培养物含有大量的序列变株（Domingo and Holland，1988）。因此，对于准种的概念的现实性没有疑问（参见第Ⅰ节A）。

但是很难把突变速率和病毒目前或在过去一段进化时间内在田间可能发生的实际变化速率联系起来。理由包括下列各项：

a. 一种病毒的基因组的不同部分变化速率的差异

如第6～8章所述，病毒基因组的非编码区，特别是在作为病毒RNA翻译和复制识别位点的5′端和3′端，可能在一个病毒科或属的成员间高度保守。另一方面，在有多分体基因组的病毒中，可能一个基因组片段是保守的，另一个是高度变异的，就像烟草脆

裂病毒属病毒的 RNA 1 和 RNA 2 一样（图 6.38）。由于蛋白质功能的需要，衣壳蛋白可能在某些区域比其他区域更加高度保守，如 TMV 的衣壳蛋白（图 2.5）和马铃薯 Y 病毒属病毒的衣壳蛋白（图 17.2）。

b. 在一个时期内变化的不均一速率

在一个植物体内对一种病毒的复制和移动施加选择压力的环境几乎完全由寄主的内部环境（internal milieu）造成。其他对生存的选择压力包括从植物到植物的传播，如由无脊椎动物或其他介体介导的传播。病毒转移到一个新的寄主种类中可能会在很短的时间内受到诱导从而发生迅速的进化。不同部位有突变的病毒基因组间的重组可能会加速这一过程。新病毒在新寄主内经过这一个阶段之后可能会进入一段时间的稳定期。在一个比较短的时期内，这种情形可以从某种程度上与从无脊椎动物某些组群进化的化石记录上推论出的阵发式进化（episodic evolution）或"断续平衡"（punctuated equilibria）相类比（Eldredge，1985）。

一种病毒在一种新寄主内得以立足的一个途径是和另外一种能正常侵染该种寄主的病毒一起侵染。例如，在正常情况下 TMV 不会系统侵染小麦，但如果该植株已经受 BSMV 侵染，那么 TMV 就能系统侵染小麦；可能 BSMV 的移动蛋白能够补偿 TMV 移动的局限性（参见第 9 章第Ⅱ节 D.6）。

c. 精确历史数据的缺乏

直到最近才发现，芜菁黄花叶病毒属（*Tymovirus*）的成员——TYMV 在自然条件下只在西欧发生。然而，很早就发现一个密切相关的病毒在澳大利亚一个孤立的地方侵染该地特有的一种十字花科碎米荠属植物（*Cardamine lilacina*）（Keese *et al.*，1989）。Blok 等（1987 b）根据欧洲和澳大利亚的 TYMV 种群的基因组序列计算出这两个株系在过去 10 000 年间的变异至多只有 1%左右。这是我们对于一种植物病毒在一段地质时期中可能的进化速率的唯一估测。然而，该估计值主要根据关于寄主碎米荠属（*Cardamine*）的生物地理数据，它们本身也可能有相当大的误差（Guy and Gibbs，1985）。此外，1% 的差异可能是由于过去某一短时期内为了适应不同属的寄主而发生的迅速变化过程而不是过去上万年中发生的缓慢变化。从格陵兰（Greenland）大约有 140 000 年历史的冰川的冰核中（glacial ice core）发现的 ToMV 的序列与当代的分离物几乎完全相同（Castello *et al.*，1999）。然而，现在尚未确定病毒是否与冰属于同一时代。

第XIV节 病毒及其寄主与介体的协同进化

A. 病毒、寄主植物和无脊椎动物介体的协同进化

Fahrenholtz 法则（Fahrenholtz's rule）提出，寄生物及其寄主在物种形成时有同时（一致）性（Eichler，1948）。因此，有预测认为寄生物及其寄主的系统发育树在拓扑学上应该是相同的。Hafner 和 Nadler（1988）利用蛋白质电泳数据获得了啮齿类动物及其外寄生物的系统发育树，证明了它们有共物种形成（cospeciation）的历史。鉴于许多当代的植物病毒有广泛的寄主范围，不能期望病毒及其寄主会严格符合 Fahren-

holtz 法则。然而，现在普遍公认病毒有很长的进化历史，并且与其寄主生物协同进化。在本节中，将会考虑这一观点与植物病毒相关的方面。在讨论这一观念时，作者不想暗示病毒在这方面已经随着它们的植物寄主发展到有高度复杂性的状态。相反，现有的证据表明侵染光合生物的最大最复杂的病毒是从最简单的寄主（一种类似小球藻的绿藻）上发现的。

B. 被子植物和昆虫的进化

化石记录显示，最近的主要进化暴发（evolutionary explosion）发生于白垩纪（Cretaceous）的初期（大约在 1 亿 3500 万年以前）。在那时单子叶植物和双子叶植物出现了，并且各种不同的哺乳动物和鸟类也出现了。一些昆虫目在泥盆纪（Devonian）（4 亿年以前）已经进化出来，但是随着高等植物的出现几个重要的目产生了大量的新类型。其中许多昆虫与其食物——被子植物协同进化。因此，在白垩纪时期有些已经在昆虫中存在的病毒可能已适应了在进化着的哺乳动物和被子植物中复制。

化石记录表明被子植物直到白垩纪初期（即大约在 1 亿 3000 万年以前）才出现，被子植物主要的早期多样化发生在白垩纪中期（Crane and Lidgard，1989；Crane *et al.*，1995；Qiu *et al.*，1999）。然而，叶绿体 DNA 序列数据显示单子叶植物和双子叶植物是在大约 2 亿至 4000 万年以前从一个共同的祖先分离开的（Wolfe *et al.*，1989）。因此，现在侵染被子植物的病毒可能在这个趋异分化的时期与其寄主一起进化，至少在它们的主要寄主专化性方面是如此。这是假定病毒在被子植物进化的早期阶段传播到了被子植物上。

C. 只侵染昆虫的病毒向植物的水平传播

稻褐飞虱（褐稻虱）（*Niloparvata lugens*）的一种病毒（NLRV）的粒子与侵染植物的斐济病毒属病毒（fijiviruses）粒子相似。NLRV 侵染飞虱并在其中进行增殖，通过飞虱的卵进行传播。该病毒不能在其昆虫的寄主植物水稻上进行增殖。然而，当感染病毒的飞虱在植物上取食时，病毒被注射到植物中，并在植物体内进行暂时的循回。该病毒能侵染同时在该植物上取食的健康飞虱。因此，水稻植株可以被看作是这种昆虫病毒的循回型、但非持久性的介体（Nakashima and Noda，1995）。叶蝉病毒 A（Boccardo *et al.*，1980；Ofori and Francki，1985）和玉米飞虱（*Perigrinus maidis*）病毒（Falk，1988）可能存在相似的情形。

一种侵染禾谷缢管蚜（*Rhapalosiphum padi*）的病毒（RhPV）有直径为 27 nm 的二十面体粒子，含有一个 ssRNA 分子。它可经蚜虫的卵传播，但不能在蚜虫的寄主植物中复制。然而，当受病毒侵染的和健康的蚜虫同时在同一个大麦叶片上取食时，健康的蚜虫会被感染（Gildow and D'Arcy，1988）。像 LAV 和 RhPV 这样的病毒经过很长一段时间后可能会获得一个或几个基因使得它们既能在昆虫体内又能在植物中侵染和复制。

D. 在昆虫和植物中复制的病毒的亲和力

呼肠病毒科（*Reoviridae*）的一些成员能同时侵染脊椎动物和无脊椎动物，其他成

员能同时侵染无脊椎动物和植物。寄主的这种分类学上的分布表明该病毒科可能最初起源于更古老的无脊椎动物。许多特征支持植物呼肠病毒（plant reoviruses）来源于叶蝉介体的观点（Conti，1984；Nault，1987；Nault and Ammar，1989）：

（1）斐济病毒属病毒（fijiviruses）在形态上和只能在昆虫中复制的LAV相似，与玉米飞虱病毒也相似（Falk *et al.*，1988）。

（2）所有已知的植物呼肠病毒都能在它们的叶蝉或飞虱介体（hopper vector）中复制。

（3）植物呼肠病毒不能由种子传播，除了在特殊环境下外也不能通过机械方式传播。因此，它们的生存完全地依赖于叶蝉或飞虱介体。

（4）呼肠病毒侵染的植物通常是其叶蝉或飞虱介体的主要食物和繁育寄主。

（5）植物呼肠病毒好像更能适应它们的叶蝉或飞虱寄主，因为：①它们在昆虫体内复制的水平更高；②几种植物呼肠病毒能通过昆虫的卵传播，但都不能通过植物种子传播；③在特定介体种群内携带病毒的昆虫的百分率比单头叶蝉或飞虱取食后受侵染植物的百分率高；④有些呼肠病毒在叶蝉或飞虱体内引起细胞病理学变化，但总起来说，这些病毒在昆虫中的致病作用比它们在寄主植物内轻得多。事实上，大部分可以看作是隐症侵染。

与呼肠病毒科一样，弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）的成员都有非常相似的粒子形态和基因组策略，有的侵染脊椎动物和无脊椎动物，有的侵染无脊椎动物和植物。这说明该科的病毒共同起源于昆虫介体。这些病毒不能由种子传播，但可以通过介体的卵传播。大部分不能在它们的昆虫介体内引起病害。这种情形比植物呼肠病毒更为复杂，因为不同的植物弹状病毒（plant rhabdoviruses）有叶蝉/飞虱、蚜虫、网蝽（piesmid）或螨类等不同的介体。也许一种弹状病毒可以从一个科的介体传播到和它有共同寄主植物的另外一个科的介体中，这在过去是很少发生的事件（Nault，1991）。与此观点相关的例子是，当一种侵染脊椎动物的弹状病毒——水泡性口炎病毒（vesicular stomatitis virus）被注射到一种植物病毒的叶蝉介体内时能够复制（Lastra and Esparza，1976）。

根据第2章（第Ⅲ节H）中讨论的证据，番茄斑萎病毒属病毒（tospoviruses）现在属于布尼亚病毒科（*Bunyaviridae*）。该科含有200余种侵染热血和冷血脊椎动物以及节肢动物的病毒。这些病毒分别由蚊子、白蛉（sandfly）或蜱（tick）传播。番茄斑萎病毒属病毒由蓟马（thrips）传播，而且可以在蓟马中复制。布尼亚病毒科的病毒很可能像呼肠病毒和弹状病毒一样起源于它们的昆虫介体。几乎可以确定纤细病毒属病毒（tenuiviruses）起源于昆虫。玉米细条病毒属病毒（marafiviruses）可能也是如此，但证据不是那么有说服力。

兽棚病毒（*Flock House virus*，FHV）是属于（小型RNA病毒）野田病毒科（*Nodaviridae*）的一种昆虫病毒。它在本质上与植物没有已知的关系。然而，Selling等（1990）证明用FHV RNA机械接种植物时该病毒在几种植物的叶片中能进行低水平的复制。用完整病毒接种植物后检测不到病毒的复制。然而，用完整的FHV接种大麦原生质体则会有少量子代病毒粒体的合成，说明该病毒在植物细胞内能够脱壳。FHV粒子可以在本生烟（*Nicotiana benthamiana*）中系统移动，但在系统移动的叶片中检测不到病毒的复制。该病毒在其侵染的植物上不引起症状。这些结果表明差异很大

的不同生物的内部环境可能非常相似，简单的 RNA 病毒一旦进入细胞便可以进行复制。这可能是过去进化过程的一个因素。

侵染脊椎动物的圆环病毒科病毒（circoviruses）和侵染植物的矮缩病毒科病毒（nanoviruses）都是具有一些共同特征的小的环状单链 DNA 基因组。Gibbs 和 Weiler（1999）分析了二者的 Rep 蛋白质序列，发现它们的 N 端有相似性，但杯状病毒科病毒（caliciviruses）Rep 的 C 端和类似小 RNA 病毒科病毒（picorna-like virus）的 2C 蛋白质有关。他们认为圆环病毒属病毒是从矮缩病毒进化而来，即矮缩病毒的 DNA 转移到动物体内后接着又发生了一次重组。

E. 植物病毒对其目前无脊椎动物介体的适应

化石记录表明同翅目（Homoptera）的主要分类组群是在大约 1 亿 8000 万年以前的上三叠纪（Upper Triassic）分化出来的（Hennig，1981）。如第 11 章所述，在植物病毒的介体中，有些蚜虫种类只传播一种病毒，其他的如桃蚜（*Myzus persicae*）可以传播许多种病毒。有一些病毒只能被一种蚜虫传播，而其他的病毒可被许多蚜虫传播。对蚜虫介体进行的系统发育变异分析表明，有些蚜虫比其他一些组群的蚜虫更适合于作特定病毒的介体。例如，Zettler（1967）证明蚜亚科（*Aphidinae*）的蚜虫比斑蚜亚科（*Callaphidinae*）或毛蚜亚科（*Chaitophorinae*）的蚜虫更适合于作 BCMV 的介体。这种差异被归因于探食（probing）行为的不同。Nault 和 Madden（1988）比较了 13 个属 25 种叶蝉传播 MCDV 的效率。他们得出的结论是，属于角顶叶蝉族（Deltocephalini）或最近的（高级的）殃叶蝉族（Euscelini）的、以玉米作为取食和繁育寄主的叶蝉种类较有可能是 MCDV 的介体，而属于其他分类单位的种类即便是在玉米上取食良好作为介体的可能性也很小。

在双生病毒中，粉虱传播的病毒都有同一个介体种类——烟粉虱（*Bemisia tabaci*）。在免疫吸附电子显微镜测试中，粉虱传播的 5 种病毒间有明显的关系（Roberts *et al.*，1984）。用单克隆抗体（参见第Ⅱ节 B.4）和核酸杂交（用含有衣壳蛋白基因的 DNA1）都得到了相似的结果。粉虱传播的病毒和叶蝉传播的病毒之间未发现任何亲缘关系。粉虱传播的病毒寄主范围相差很大，在许多国家都有分布，有的能通过汁液传播有的不能经汁液传播。Roberts 等（1984）认为这些关系可能和衣壳蛋白在这些病毒的介体传播中起的关键作用有关。

假定这与亲族（descent）相关，并且假定植物呼肠病毒和弹状病毒起源于昆虫，Nault（1987）确定了在可能已发生的这种联系中介体组群进化期间的最新阶段（图 17.21）。然而，双生病毒起源于昆虫的观点值得怀疑，因为它们不能在其介体中增殖。

植物病毒及其甲虫介体可能是一起进化的，尽管病毒不能在该类介体内复制。芜菁黄花叶病毒属（*Tymovirus*）的例子很有意义。这一个组的大多数成员有一个相当窄的寄主范围，如果只考虑自然寄主的话，通常在一个植物科内。双子叶植物 6 个亚纲中的寄主科不是随机发生的。在木兰亚纲（Magnoliidae）或 Hammaelidae 这两个含有双子叶植物中比较古老的科的亚纲中没有发现病毒寄主。

芜菁黄花叶病毒属病毒（tymoviruses）的叶甲（chrysomelid）和象甲（curculionid）介体与它们传播的病毒之间有专化性关系。它们在少数植物种类上取食，通常在构

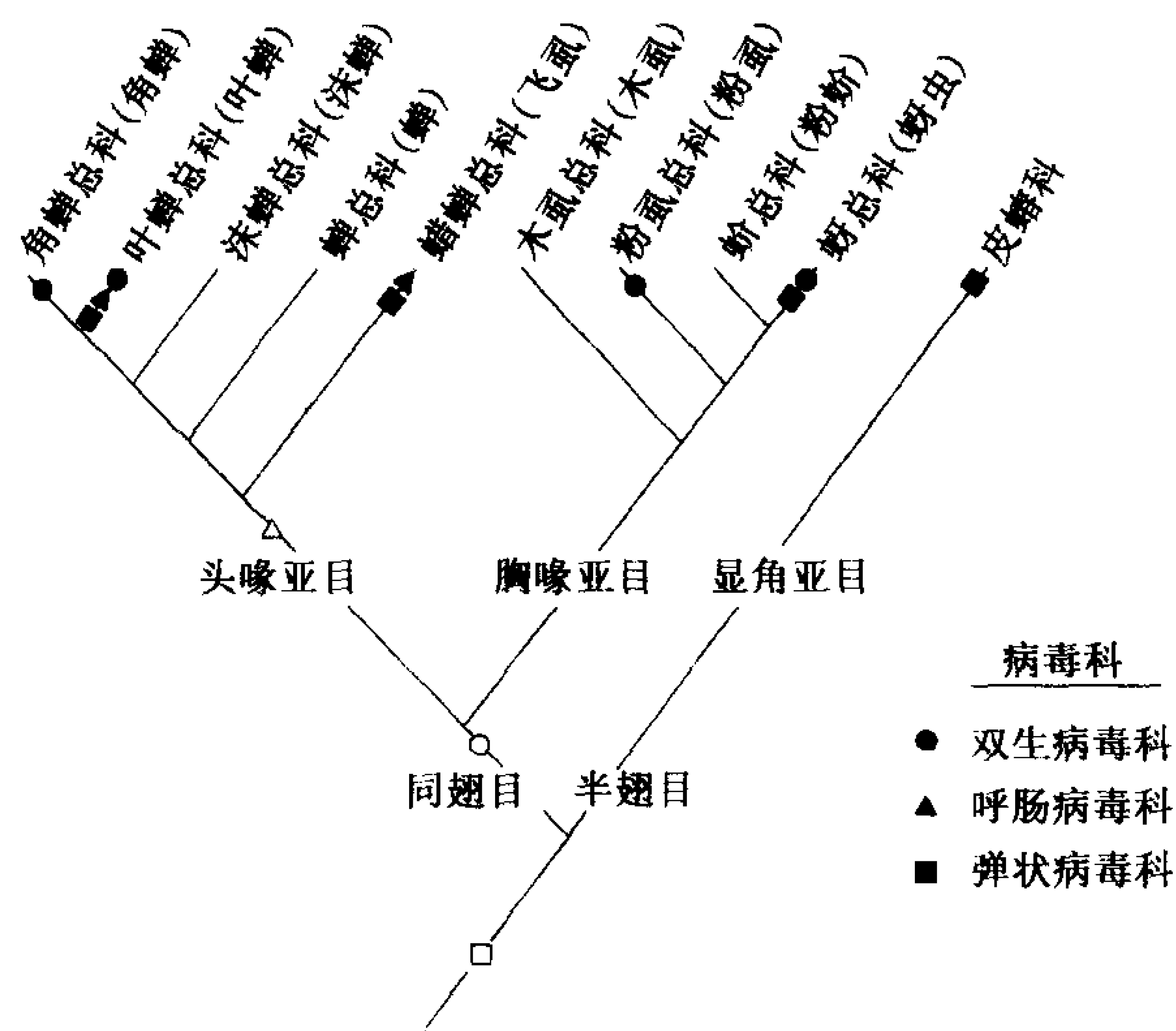


图 17.21 植物病毒科与介体种类间可能的协同进化。同翅目几个总科的系统发生树，各类昆虫的普通名称附在括号内。图中所示的是作为双生病毒科、呼肠病毒科和弹状病毒科介体的同翅目昆虫种类（和一个半翅目的种类）。假定这些病毒的祖先和同翅目昆虫联系在一起，处于下部的空心符号表示可能已发生这种联系的最近时间。引自 Nault（1987）。注：①植物呼肠病毒属（*Phytoreovirus*）是由叶蝉传播的，斐济病毒属是由飞虱传播的。②TPCTV是一种双生病毒，它由角蝉传播，而另一种可能的双生病毒，燕麦褪绿条纹病毒，是由一种蚜虫传播的。引自 Mathews（1991）。

成病毒寄主范围的植物科内。象甲科（Curculionaidae）最早的化石的直接证据要追溯到上侏罗纪（Upper Jurassic），叶甲科（Crysomelidae）要追溯到始新世中期（Middle Eocene）（Crowson *et al.*，1967）。因此，虽然化石记录非常缺乏，但是它与寄主植物、甲虫介体和芜菁黄花叶病毒属病毒在始新世（Eocene）时期一起经过了实质性的进化多样性分化这一观点还是一致的。

植物病毒对其无脊椎动物介体的适应在不同的时间标度（time scale）上可能有几个不同的过程，而阐明这些过程是非常困难的。这些过程包括：①图 17.21 中提出了在一个地质时间标度内按亲族划分的进化起源；②对特定介体种类的适应可能是最近的事情，例如，马铃薯 Y 病毒属病毒通过病毒衣壳蛋白或辅助蛋白上的突变变化来适应介体；③进化起源包括协同进化和亲族，及新的介体组的直接定殖，例如，此类定殖可以解释植物弹状病毒既有昆虫介体又有螨类介体的事实（如 CoRSV）（Nault，1987）。

第Ⅹ Ⅴ节 讨论及小结

越来越多的证据支持病毒基因组的模块结构，病毒基因组包括基础核心复制子以及为使复制子适应病毒占据的小生境（生态位）而增加的模块。隐潜病毒的构成（参见第2章第Ⅲ节 E）似乎是基本复制子加上可能是复制复合体一部分的衣壳蛋白。它们的 dsRNA 基因组编码一个复制酶和病毒衣壳蛋白，但没有促进细胞间移动或植株间传播

的因子。这些病毒可能代表失去了各种功能的病毒，或者是尚未获得其他功能模块的现代植物病毒的前体（Roossinck，1997）。在包括栽培水稻（*Oryza sativa*）（Moriyama *et al.*，1995）、野生稻（*O. rufipogon*）（Moriyama *et al.*，1999）、蚕豆（*Vicia faba*）（Pfeiffer，1998）、菜豆（*Phaseolus vulgaris*）（Wakarchuk and Hamilton，1990）和大麦（Zabalgogeazcoa and Gildow，1992；Zabalgogeazcoa *et al.*，1993）等几种植物中发现了大型的双链 RNA（dsRNA）。这些所谓的"内源 dsRNA"看来不能进行水平传播，一直被认为是一类 RNA 质粒。它们的基因组比隐潜病毒大得多（分别为 10～17 kb 和 2～3 kb），但与隐潜病毒不同的是，这些内源 dsRNA 看来不与粒子相连。在基因组大小和缺乏粒子方面它们与侵染真菌的低毒病毒科（*Hypoviridae*）相似（参见第 2 章第Ⅵ节 B），但是它们的基因组组构不一样。有人通过分析与植物相伴随的内源 dsRNA 的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶得出了它们是从"有缺陷的"ssRNA 病毒进化而来的结论（Gibbs *et al.*，2000）。有些从亲缘关系很远的植物上得到的 dsRNA 密切相关，表明它们与其寄主的物种形成并非严格一致。

关于病毒进化的很多讨论是针对正单链 RNA 病毒的。这一点并不奇怪，因为大多数植物病毒都具有这种类型的基因组，而且多数结论也适用于负链 RNA 病毒和双链 RNA 病毒。Koonin 和 Dolja（1993）制订了讨论 RNA 病毒进化时需要考虑的五项原则：

（1）RNA 病毒进化很快。因此，只有重要功能的模体在许多病毒组中是保守的。

（2）正义 RNA 病毒基因组（以及其他病毒的基因组）由有限数目的模块组成。普遍存在的模块是编码 RdRp 和衣壳蛋白的基因。只有 RdRp 包含所有正链 RNA 病毒中都保守的通用序列模体。因此，对 RdRp 序列的系统发育分析不可避免地形成了产生这一组病毒的连贯的进化图景的基础。这也适用于具有其他类型聚合酶的病毒组群。

（3）正链 RNA 病毒的进化受到两个相反趋势的影响，一个是不同基因（主要是编码参与 RNA 复制的蛋白质的基因）排列的保守性，另一个是基因和基因模块的重组性改组（recombinational shuffling）。

（4）重组的频率（即使是对关系较远的病毒）使得在理论上证明正链 RNA 病毒的进化史作为单一的系统发育树是不可能的。描述必须是垂直的（树状）与水平的遗传信息流的复杂组合。

（5）系统发育和基因组复制与表达的策略间的相关性是有限的，表明基本的表达和复制机制可能已经进化了不止一次。

病毒的单源（monophyletic）或多源的（polyphyletic）起源问题已经被广泛地讨论。鉴于大多数病毒（如果不是所有病毒）的模块排列和假定的模块进化，我们应该考虑模块是有一个还是多个起源。在大多数情况下，讨论以复制子为基础，就 RNA 病毒而言，对复制子的起源有几种不同的观点（参见第Ⅸ节 A.1）。有更强的建议支持反转录酶和参与单链 DNA 植物病毒复制的模块具有单一的起源。对于植物病毒的其他模块，建议是多数来源于寄主并适应了病毒的特定用途。由于核酸复制过程中因缺少校正作用而导致的变异以及对病毒需要的适应，可能不会发现与寄主基因的序列相似性。然而，确定功能的相似性是可能的；这对细胞间移动蛋白来说更为明显（参见第Ⅺ节 D）。

Koonin 和 Dolja（1993）认为正链 RNA 病毒系统发育分类的基础应该是复制酶和

衣壳蛋白的“核心”基因复合体。基于此，他们提出把这些病毒归类于3个纲内。虽然在将这3个纲作为正式的分类方面还有相当的保留意见，核心基因组组构的相互间关系的分析为将来讨论病毒进化途径提供了材料。他们认为这3个纲的祖先起源于一个共同的祖先（图17.22）。

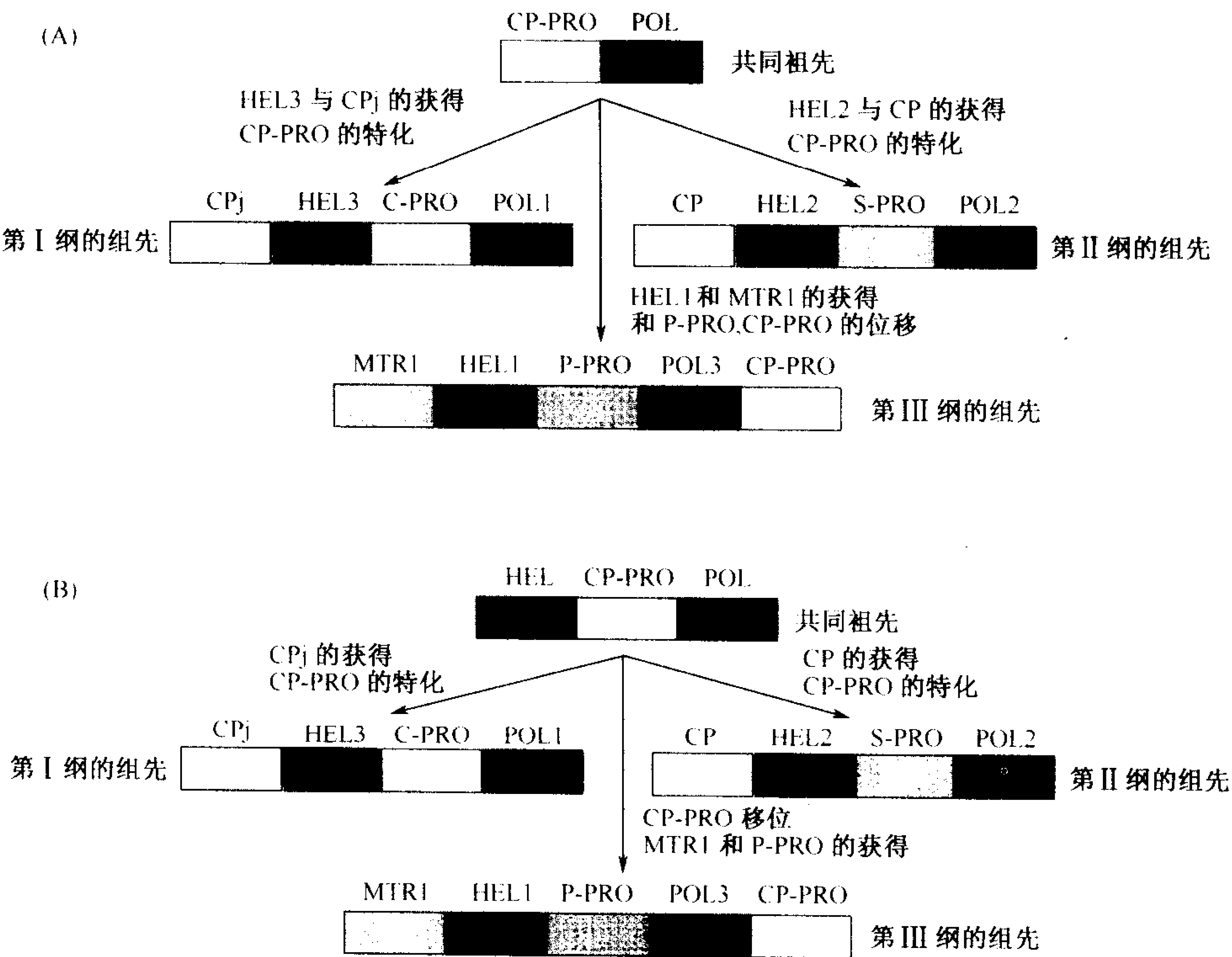


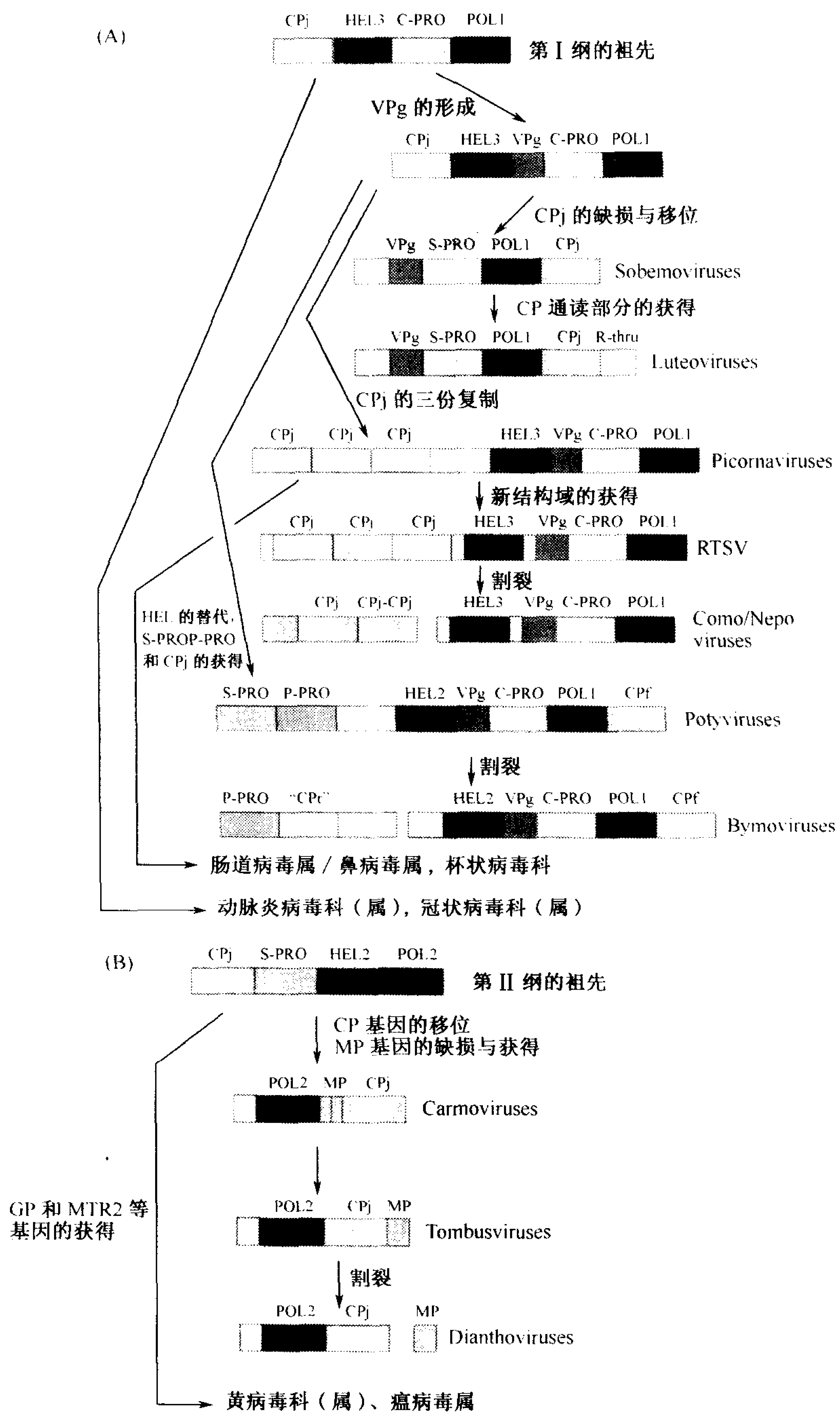
图17.22 由一个假设的共同祖先病毒进化产生3个病毒纲祖先的两种假说。(A)“基因捕获”(gene capture)假说。最早的祖先含有2个基因，衣壳蛋白作为自切割蛋白酶只在其C端进行一次自动切割。(B)“原始病毒”(primordial)假说。最早的祖先推定含有3个基因，原始的衣壳蛋白作为自切割蛋白酶在其N端和C端进行2次切割。各种符号的解释见图17.17。承蒙版权所有者（©CRC Press LLC）惠允，引自Koonin和Dolja（1993）。

他们从这3个纲的祖先出发，提出了各病毒组群进化的可能图景（图17.23）。这是以1993年的分类为基础的，不包括现在所有的组群。然而，这些图景说明了正链RNA病毒可能的进化途径。

非核心模块的获得在很大程度上是由寄主和介体主导的。

有力的证据表明病毒、寄主和介体是协同进化的。长线病毒属病毒是与介体协同进化的一个好例子（Karasev，2000）。对复制相关基因和HSP70进行的系统发育分析表明进化导致了与蚜虫、粉蚧和粉虱介体相关的3个主要谱系。

然而，重要的是应记住研究最多的病毒是那些引起作物重要病害的病毒。现代作物品种有相对短、迅速而复杂的进化历史（Gaut *et al.*，2000）。得出病毒与这样的植物种类协同进化的概念时应该慎重。


(A)
CPj HEL3 C-PRO POL1
第 I 纲的祖先
VPg 的形成
CPj HEL3 VPg C-PRO POL1
CPj 的缺损与移位
VPg S-PRO POL1 CPj
Sobemoviruses
CP 通读部分的获得
VPg S-PRO POL1 CPj R-thru
Luteoviruses
CPj 的三份复制
CPj CPj CPj HEL3 VPg C-PRO POL1
Picornaviruses
新结构域的获得
CPj CPj CPj HEL3 VPg C-PRO POL1
RTSV
割裂
CPj CPj-CPj HEL3 VPg C-PRO POL1
Como/Nepo viruses
HEL 的替代，S-PROP-PRO 和 CPj 的获得
S-PRO P-PRO HEL2 VPg C-PRO POL1 CPf
Potyviruses
割裂
P-PRO "CPf" HEL2 VPg C-PRO POL1 CPf
Bymoviruses
肠道病毒属 / 鼻病毒属，杯状病毒科
动脉炎病毒科（属），冠状病毒科（属）
(B)
CPj S-PRO HEL2 POL2
第 II 纲的祖先
CP 基因的移位
MP 基因的缺损与获得
POL2 MP CPj
Carmoviruses
GP 和 MTR2 等基因的获得
POL2 CPj MP
Tombusviruses
割裂
POL2 CPj MP
Dianthoviruses
黄病毒科（属）、瘟病毒属

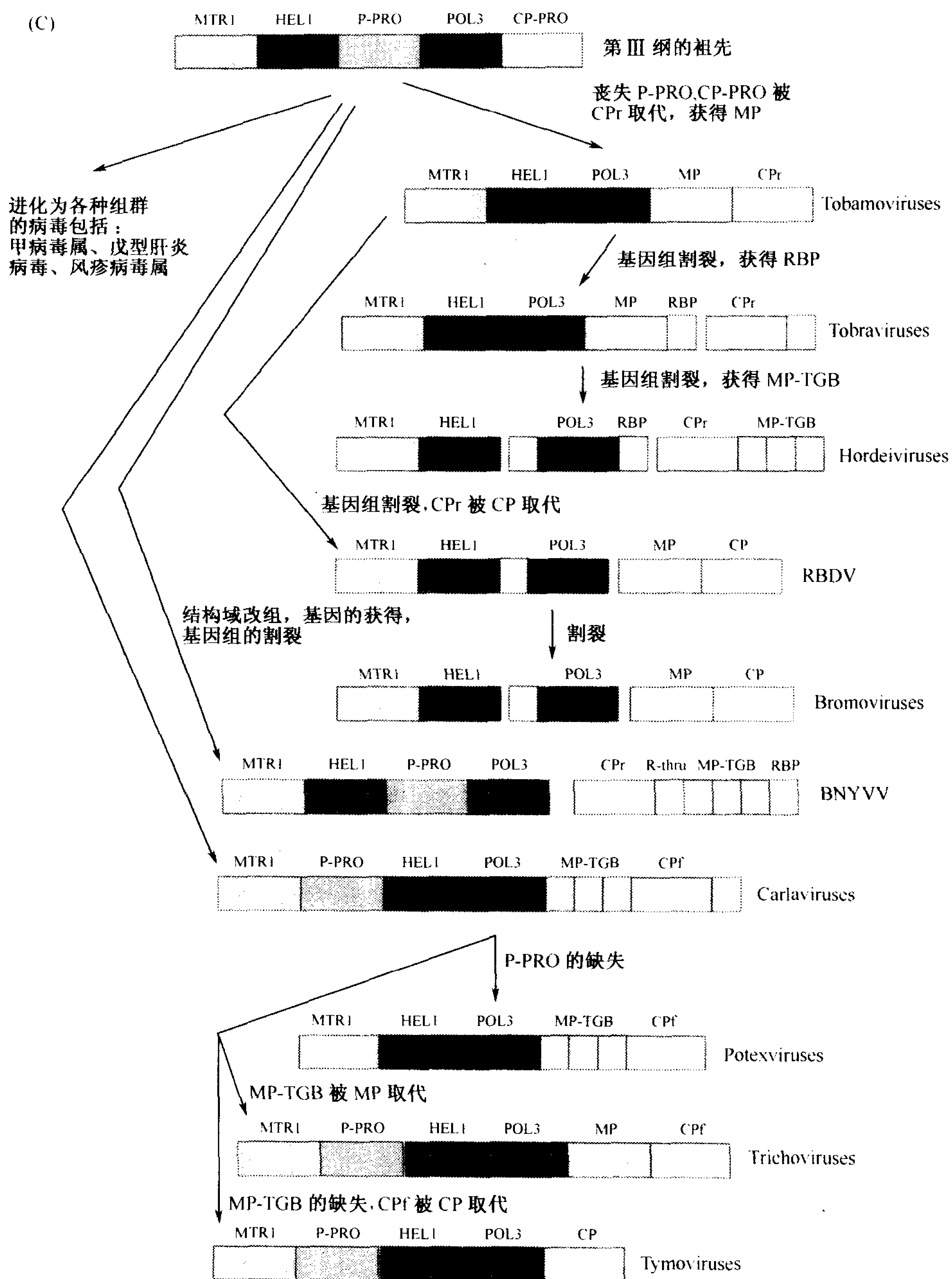


图 17.23 几种类型的正链 RNA 病毒的进化假说：(A) 第一种纲；(B) 第二种纲；(C) 第三种纲。CPj，带"胶冻卷"(jellyroll) 构象的二十面体衣壳蛋白；CPf，线状衣壳蛋白；CPr，杆状衣壳蛋白；CP-Pro，衣壳蛋白自切割蛋白酶；MP，移动蛋白；MP-TGB，三基因块移动蛋白；RBP，(推定的) RNA 结合蛋白；R-thru，通读蛋白；VPg，与基因组连锁的病毒蛋白；其他缩写的解释见图 17.17。承蒙版权所有者（© CRC Press LLC）惠允，引自 Koonin 和 Dolja (1993)。

注：表中病毒属名可在附录 2C 中查询——译者。

另外一个对搞清现在病毒的古老起源有利的方面是一些组群的地理分布。除了人之外，芜菁黄花叶病毒属的成员没有其他已知的在洲际间传播的方式。在欧洲、北美和南美、非洲、亚洲和大洋洲发生着不同的芜菁黄花叶病毒属病毒。这些洲在侏罗纪时期结束的时候还在一个大陆中。现在的芜菁黄花叶病毒属病毒可能是在 1 亿 3800 万年到 8000 万年前大陆漂移分开时由一个共同的祖先分化的。从这一点上讲，在澳洲碎米荠（*Cardamine*）中发现的 TYMV 株系可能是反常的。然而，欧洲的和澳大利亚的 TYMV 都在芸薹属的（brassicaceous）寄主中发现这一事实表明它们的进化趋异可能已经受到了抑制。

由双生病毒衣壳蛋白或复制相关蛋白质氨基酸序列得到的系统发育树表明旧大陆和新大陆双生病毒间的地理隔离可能在该组群病毒的进化中起作用（Howarth and Vandemark，1989）

现在的病毒和寄主分布是与病毒进化问题相关的另外一个方面。含有一个植物属的许多种类和品种的地区可以作为代表已经发生属内进化的一个地点。例如，与马铃薯相关的茄属植物在安第斯山脉地区进化，以位于秘鲁南部和玻利维亚北部的的的喀喀湖（Lake Titicaca）地区为中心，是马铃薯首先被驯养的地方（Hawkes，1967）。多数侵染马铃薯的病毒在自然界中仅局限于茄属（*Solanum*）植物，例如，香石竹潜隐病毒属（*Carlavirus*）的 PVS、马铃薯 X 病毒属（*Potexvirus*）的 PVX、豇豆花叶病毒属（*Comovirus*）的 APMoV、芜菁黄花叶病毒属（*Tymovirus*）的 APLV 和马铃薯帚顶病毒属（*Pomovirus*）的 PMTV。几乎可以肯定，这些病毒是借助马铃薯块茎从安第斯山脉（Andes）传播到世界其他地方的。已经进行的详尽研究表明，这些病毒在安第斯山脉区域内表现出明显的变异。例如，APLV 的 26 个分离物被分到 3 个血清学组中，一个组只在该区域的南方发现，一个组只在北方发现，第三个组分布于整个地区（Koenig *et al.*，1979）。APLV 和其他在安第斯地区广泛分布的病毒（如 APMoV）只能在海拔 2000～4000 m、具备冷凉条件的马铃薯种植区才能大量复制（Fribourg *et al.*，1977）。病毒株系的多样性、气候适应和某些株系局限于部分地区的地理限制支持这样一个观点，即包括马铃薯在内的茄属植物和马铃薯的主要病毒在安第斯山脉地区已经过协同进化，并且还在继续进行着协同进化。

上面已介绍过地理因素对 YMV（参见第Ⅹ节 C.5）和 CLCuV（参见第Ⅹ节 C.7）等病毒进化的影响等类似的例子。

对现有病毒研究得到的大量实验数据表明病毒仍然在进化，但大多数病毒和病毒基因的进化速率难以准确地研究确定。一些新的因素可能影响植物病毒进化的速率。农业栽培体系的改变导致大面积单一种植、同一种类的交叠种植以及将新的种类引入到特定的地区。日益增加的国际旅行和贸易正将新病毒带到许多地区，同时也可能把新的介体传到新的地区。因此，对病毒变株的选择压力一直在变化，新的病毒组合共同侵染的可能性给重组提供了更多的机会。对这些和其他的社会变革对新病毒出现的影响加以观察是很有意义的。

参 考 文 献

A'Brook, J. (1964). The effect of planting date and spacing on the incidence of groundnut rosette disease and of the vector *Aphis craccivora*, Koch, at Mokawa, Northern Nigeria. *Ann. Appl. Biol.* **54**, 199–208.

A'Brook, J. (1968). The effect of plant spacing on the numbers of aphids trapped over the groundnut crop. *Ann. Appl. Biol.* **61**, 289–294.

A'Brook, J. (1973). The effect of plant spacing on the number of aphids trapped over cocksfoot and kale crops. *Ann. Appl. Biol.* **74**, 279–285.

Aapola, A.I.E. and Rochow, W.F. (1971). Relationships among three isolates of barley yellow dwarf virus. *Virology* **46**, 127–141.

Aaziz, R. and Tepfer, M. (1999a). Recombination between genomic RNAs of two cucumoviruses under conditions of minimal selection pressure. *Virology* **263**, 282–289.

Aaziz, R. and Tepfer, M. (1999b). Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *J. Gen. Virol.* **80**, 1339–1346.

Aaziz, R., Dinant, S. and Epel, B.L. (2001). Plasmodesmata and plant cytoskeleton. *Trends Plant Sci.* **6**, 326–330.

Abad-Zapatero, C., Abdef-Meguid, S.S., Johnson, J.E. *et al.* (1980). The structure of Southern bean mosaic virus at 2.8 Å resolution. *Nature (London)* **286**, 33–39.

Abbink, T.E.M., Tjernberg, P.A., Bol, J.F. and Linthorst, H.J.M. (1998). Tobacco mosaic virus helicase domain induces necrosis in *N* gene-carrying tobacco in the absence of virus replication. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 1242–1246.

Abdel-Meguid, S.S., Yamane, T., Fukuyama, K. and Rossmann, M.G. (1981). The location of calcium ions in southern bean mosaic virus. *Virology* **114**, 81–85.

AbouHaidar, M.G. (1983). The structure of the 5′ and 3′ ends of clover yellow mosaic virus RNA. *Can. J. Microbiol.* **29**, 151–156.

AbouHaidar, M.G. (1988). Nucleotide sequence of the capsid protein gene and 3′ non-coding region of papaya mosaic virus RNA. *J. Gen. Virol.* **69**, 219–226.

AbouHaidar, M.G. and Erickson, J.W. (1985). Structure and *in vitro* assembly of papaya mosaic virus. In: J.W. Davies (ed.) *Molecular Plant Virology*, Vol. 1, pp. 85–121. CRC Press, Boca Raton.

AbouHaidar, M.G. and Gellatly, D. (1999). Potexviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1364–1368. Academic Press, San Diego.

AbouHaidar, M.G. and Paliwal, Y.C. (1988). Comparison of the nucleotide sequences of viroid-like satellite RNA of the Canadian and Australasian strains of lucerne transient streak virus. *J. Gen. Virol.* **69**, 2369–2373.

Abu Salih, H.S., Ishag, H.M. and Siddig, S.A. (1973). Effect of sowing date on incidence of Sudanese broad bean mosaic virus in and yield of, *Vicia faba*. *Ann. Appl. Biol.* **74**, 371–378.

Accotto, G.P. and Boccardo, G. (1986). The coat proteins and nucleic acids of two beet cryptic viruses. *J. Gen. Virol.* **67**, 363–366.

Accotto, G.P., Riccioni, L., Barba, M. and Boccardo, G. (1997). Comparison of some molecular properties of Ourmia melon and Epirus cherry viruses, two representatives of a proposed new virus group. *J. Plant Pathol.* **78**, 87–91.

Accotto, G.P., Vaira, A.M., Noria, E. and Vecchiati, M. (1998). Using non-radioactive probes on plants: a few examples. *J. Biolum.Chemilum.* **13**, 295–301.

Acs, G., Klett, H., Schonberg, M., Christman, J., Levin, D.H. and Silverstein, S.C. (1971). Mechanism of reovirus double-stranded ribonucleic acid synthesis *in vivo* and *in vitro*. *J. Virol.* **8**, 684–689.

Adam, G. and Hsu, H.T. (1984). Comparison of structural proteins from two potato yellow dwarf viruses. *J. Gen. Virol.* **65**, 991–994.

Adam, G., Gaedigk, K. and Mundry, K.W. (1983). Alterations of a plant rhabdovirus during successive mechanical transfers. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* **90**, 28–35.

Adams, A.N. and Barbara, D.J. (1982). The use of $F(ab')_2$-based ELISA to detect serological relationships among carlaviruses. *Ann. Appl. Biol.* **101**, 495–500.

Adams, D.B. and Kuhn, C.W. (1977). Seed transmission of peanut mottle virus in peanuts. *Phytopathology* **67**, 1126–1129.

Adams, R.L.P., Burdon, R.H., Campbell, A.M., Leader, D.P. and Smellie, R.M.S. (1981). *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 9th edn. Chapman & Hall, London.

Adams, S.E., Jones, R.A.C. and Coutts, R.H.A. (1986a). Expression of potato virus X resistance gene *Rx* in potato leaf protoplasts. *J. Gen. Virol.* **67**, 2341–2345.

Adams, S.E., Jones, R.A.C. and Coutts, R.H.A. (1986b). Effect of temperature on potato virus X infection in potato cultivars carrying different combinations of hypersensitivity genes. *Plant Pathol.* **35**, 517–526.

Adanson, M. (1763). *Familles des Plantes*, Vol. 1. Vincent, Paris.

Adejare, G.O. and Coutts, R.H.A. (1981). Eradication of cassava mosaic disease from Nigerian cassava clones by meristem-tip culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **1**, 25–32.

Adkins, S. and Kao, C.C. (1998). Subgenomic RNA promoters dictate the mode of recognition by bromoviral RNA-dependent RNA polymerases. *Virology* **252**, 1–8.

Adkins, S., Stawicki, S.S., Faurote, G., Siegel, R.W. and Kao, C.C. (1998). Mechanistic analysis of RNA synthesis by RNA-dependent RNA polymerase from two promoters reveals similarities to DNA-dependent RNA polymerase. *RNA* **4**, 455–470.

Adolph, K.W. and Butler, P.J.G. (1977). Studies on the assembly of a spherical plant virus: III. Reassembly of infectious virus under mild conditions. *J. Mol. Biol.* **109**, 345–357.

Adomako, D., Lesemann, D.E., Paul, H.L. and Owusu, G.K. (1983). Improved methods for the purification and detection of cocoa swollen shoot virus. *Ann. Appl. Virol.* **103**, 109–116.

Adrian, M., Dubochet, J., Fuller, S.D. and Harris, J.R. (1998). Cryo-negative staining. *Micron* **29**, 145–160.

Agranovsky, A.A., Dolja, V.V., Kavsan, V.M. and Atabekov, J.G. (1978). Detection of polyadenylate sequences in RNA components of barley stripe mosaic virus. *Virology* **91**, 95–105.

Agranovsky, A.A., Dolja, V.V., Kagramanova, V.K. and Atabekov, J.G. (1979). The presence of a cap structure at the 5′ end of barley stripe mosaic virus RNA. *Virology* **95**, 208–210.

Agranovsky, A.A., Dolja, V.V., Gorbulev, V.G., Kozlov, Y.V. and Atabekov, J.G. (1981). Aminoacylation of barley stripe mosaic virus RNA: Polyadenylate-containing RNA has a 3′ terminal tyrosine-accepting structure. *Virology* **113**, 174–187.

Agranovsky, A.A., Dolja, V.V. and Atabekov, J.G. (1982). Structure of the 3′ extremity of barley stripe mosaic virus RNA: evidence for internal poly(A) and a 3′-terminal tRNA-like structure. *Virology* **119**, 51–58.

Agranovsky, A.A., Dolja, V.V. and Atabekov, J.G. (1983). Differences in polyadenylate length between individual barley stripe mosaic virus RNA species. *Virology* **129**, 344–349.

Agranovsky, A.A., Boyko, V.P., Karasev, A.V., Lunina, N.A., Koonin, E.V. and Dolja, V.V. (1991). Nucleotide sequence of the 3′-terminal half of beet yellows closterovirus RNA genome: unique arrangement of eight virus genes. *J. Gen. Virol.* **72**, 15–23.

Agranovsky, A.A., Koonin, E.V., Boyko *et al.* (1994). Beet yellows closterovirus: complete genome structure and identification of a leader papain-like third protease. *Virology* **195**, 311–324.

Agranovsky, A.A., Lesemann, D., Maiss, E., Hull, R. and Atabekov, J.J. (1995). 'Rattlesnake' structure of a filamentous plant RNA virus built of two capsids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 2471–2473.

Agrios, G.N., Walker, M.E. and Feffo, D.N. (1985). Effect of cucumber mosaic virus inoculation at successive weekly intervals on growth and yield of pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Plant Dis.* **69**, 52–55.

Aharoni, N., Marco, S. and Levy, D. (1977). Involvement of gibberellins and abscisic acid in the suppression of hypocotyl elongation in CMV-infected cucumbers. *Physiol. Plant Pathol.* **11**, 189–194.

Ahlquist, P. (1999). Bromoviruses (*Bromoviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 198–204. Academic Press, San Diego.

Ahlquist, P. and Kaesberg, P. (1979). Determination of the length distribution of poly(A) at the 3′ terminus of the virion RNAs of EMC virus, poliovirus, rhinovirus, RAV-61 and CPMV and of mouse globin MRNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1195–1204.

Ahlquist, P., Luckow, V. and Kaesberg, P. (1981). Complete nucleotide sequence of brome mosaic virus RNA3. *J. Mol. Biol.* **153**, 23–38.

Ahlquist, P., Dasgupta, R. and Kaesberg, P. (1984a). Nucleotide sequence of brome mosaic virus genome and its implications for virus replication. *J. Mol. Biol.* **172**, 369–383.

Ahlquist, P., French, R., Janda, M. and Loesch-Fries, L.S. (1984b). Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **81**, 7066–7070.

Ahlquist, P., Allison, R., Dejong, W. *et al.* (1990). Molecular biology of bromovirus replication and host specificity. In: T.P. Pirone and J.G. Shaw (eds) *Viral Genes and Plant Pathogenesis*, pp. 144–155. Springer-Verlag, New York.

Ahmed, M.E., Black, L.M., Perkins, E.G., Walker, B.L. and Kummerow, F.A. (1964). Lipid in potato yellow dwarf virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**, 103–107.

Ahola, T. and Ahlquist, P. (1999). Putative RNA capping activities encoded by brome mosaic virus: methylation and covalent binding of guanylate by replicase protein 1a. *J. Virol.* **73**, 10061–10069.

Ahola, T., den Boon, J.A. and Ahlquist, P. (2000). Helicase and capping enzyme active site mutations in brome mosaic virus protein 1a causes defects in template recruitment, negative-strand RNA synthesis and viral RNA capping. *J. Virol.* **74**, 8803–8811.

Ajayi, O. and Dewar, A.M. (1982). The effect of barley yellow dwarf virus on honeydew production by the cereal aphids, *Sitobium avenae* and *Metolophium dirhodium*. *Ann. Appl. Biol.* **100**, 203–212.

Ajayi, O. and Dewar, A.M. (1983). The effects of barley yellow dwarf virus, aphids and honeydew on *Cladosporium* infection of winter wheat and barley. *Ann. Appl. Biol.* **102**, 57–65.

Akad, F., Teverovsky, E., David, A. *et al.* (1999). A cDNA from tobacco codes for an inhibitor of virus replication (IVR)-like protein. *Plant Mol. Biol.* **40**, 969–976.

Akgoz, M., Nguyen, Q.N., Talmadge, A.E., Drainville, K.E. and Wobbe, K.K. (2001). Mutational analysis of turnip crinkle virus movement protein p8. *Molec. Plant Pathol.* **2**, 37–48.

Al Ani, R., Pfeiffer, P., Lebeurier, G. and Hirth, L. (1979a). The structure of cauliflower mosaic virus: I. pH-induced structural changes. *Virology* **93**, 175–187.

Al Ani, R., Pfeiffer, P. and Lebeurier, G. (1979b). The structure of cauliflower mosaic virus: II. Identity and location of the viral polypeptides. *Virology* **93**, 188–197.

Alam, S.N. and Cohen, M.B. (1998). Durability of brown planthopper, *Niloparvata lugens*, resistance in rice variety IR64 in greenhouse selection studies. *Entomol. Exp. Appl.* **89**, 71–78.

Albert, F.G., Fox, J.M. and Young, M.J. (1997). Virion swelling is not required for cotranslational disassembly of cowpea chlorotic mottle virus *in vitro*. *J. Virol.* **71**, 4296–4299.

Albiach-Martí, M., Mawassi, M., Gowda, S. *et al.* (2000a). Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *J. Virol.* **74**, 6856–6865.

Albiach-Martí, M.R., Guerri, J., de Mendoza, H., Laigret, F., Ballester-Olmos, J.F. and Moreno, P. (2000b). Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of citrus tristeza virus isolates. *Phytopathology* **90**, 134–138.

Albrecht, H., Geldreich, A., Menissier de Murcia, J., Kirchherr, D., Mesnard, J.-M. and Lebeurier, G. (1988). Cauliflower mosaic virus gene 1 product detected in a cell-wall-enriched fraction. *Virology* **163**, 503–508.

Alconero, R. (1973). Mechanical transmission of viruses from sweet potato. *Phytopathology* 63, 377–380.

Alconero, R., Weeden, N.F., Gonsalves, D. and Fox, D.T. (1985). Loss of genetic diversity in pea germplasm by the elimination of individuals infected by pea seedborne mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* **106**, 357–364.

Aldaoud, R., Dawson, W.O. and Jones, G.E. (1989). Rapid random evolution of the genetic structure of replicating tobacco mosaic virus populations. *Intervirology* **30**, 227–233.

Alhubaishi, A.A., Walkey, D.G.A., Webb, M.J.W., Bolland, C.J. and Cook, A.A. (1987). A survey of horticultural plant virus diseases in the Yemen Arab Republic. *FAO Plant Prot. Bull.* **35**, 135–143.

Al-Kaff, N.S. and Covey, S.N (1995). Biological diversity of cauliflower mosaic virus isolates expressed in two *Brassica* species. *Plant Pathol.* **44**, 516–526.

Al-Kaff, N.S. and Covey, S.N. (1996). Unusual accumulations of cauliflower mosaic virus in local lesions, dark green leaf tissue and roots of infected plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**, 357–363.

Al-Kaff, N.S., Turner, D.S. and Covey, S.N. (1997). Multiple pathogenic factors influence aphid transmission of cauliflower mosaic virus from infected plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**, 65–71.

Al-Kaff, N.S., Covey, S.N., Kreike, M.M., Page, A.M., Pinder, R. and Dale, P.J. (1998). Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* **279**, 2113–2115.

Al-Kaff, N.S., Kreike, M.M., Covey, S.N., Pitcher, R., Page, A.M. and Dale, P.J. (2000). Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene. *Nature Biotechnol.* **18**, 995–999.

Allen, E., Wang, S. and Miller, W.A. (1999). Barley yellow dwarf virus TNA requires a cap-independent translation sequence because it lacks a 5′ cap. *Virology* **253**, 139–144.

Allen, R.N. and Dale, J.L. (1981). Application of rapid biochemical methods for detecting avocado sunblotch disease. *Ann. Appl. Biol.* **98**, 451–461.

Allen, W.R. (1981). Dissemination of tobacco mosaic virus from soil to plant leaves under glasshouse conditions. *Can. J. Plant Pathol.* **3**, 163–168.

Allison, R.F., Dougherty, W.G., Parks, T.D. *et al.* (1985). Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* **147**, 309–316.

Allison, R.F., Johnston, R.E. and Dougherty, W.G. (1986). The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology* **154**, 9–20.

Allison, R.F., Janda, M. and Ahlquist, P. (1988). Infectious *in vitro* transcripts from cowpea chlorotic mottle virus cDNA clones and exchange of individual RNA components with brome mosaic virus. *J. Virol.* **62**, 3581–3588.

Allison, R.F., Janda, M. and Ahlquist, P. (1989). Sequence of cowpea chlorotic mottle virus RNAs 2 and 3 and evidence of a recombination event during bromovirus evolution. *Virology* **172**, 321–330.

Al-Moudallal, Z., Briand, J.P. and van Regenmortel, M.H.V. (1982). Monoclonal antibodies as probes of the antigenic structure of tobacco mosaic virus. *EMBO J.* **1**, 1005–1010.

Al-Moudallal, Z., Altschuh, D., Briand, J.P. and van Regenmortel, M.H.V. (1984). Comparative sensitivity of different ELISA procedures for detecting monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meth.* **68**, 35–43.

Al-Moudallal, Z., Briand, J.P. and van Regenmortel, M.H.V. (1985). A major part of the polypeptide chain of tobacco mosaic virus protein is antigenic. *EMBO J.* **4**, 1231–1235.

Altenbach, S.B. and Howell, S.H. (1981). Identification of a satellite RNA associated with turnip crinkle virus. *Virology* **112**, 25–33.

Altenbach, S.B. and Howell, S.H. (1984). Nucleic acid species related to the satellite RNA of turnip crinkle virus in turnip plants and virus particles. *Virology* **134**, 72–77.

Altschuh, D., Hartman, D., Reinbolt, J. and van Regenmortel, M.H.V. (1983). Immunological studies of tobacco mosaic virus: IV. Localization of four epitopes in the protein subunit by inhibition tests with synthetic peptides and cleavage peptides from three strains. *Mol. Immunol.* **20**, 271–278.

Altschuh, D., Al Moudallal, Z., Briand, J.P. and van Regenmortel, M.H.V. (1985). Immunochemical studies of tobacco mosaic virus: VI. Attempts to localize viral epitopes with monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* **22**, 329–337.

Altschuh, D., Lesk, A.M., Bloomer, A.C. and King, A. (1987). Correlation of coordinated amino acid substitutions with function in viruses related to tobacco mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **193**, 693–707.

Alzhanova, D.V., Hagiwara, Y., Peremyslov, V.V. and Dolja, V.V. (2000). Genetic analysis of the cell-to-cell movement of beet yellows closterovirus. *Virology* **268**, 192-200.

Amin, P.W. (1985). Apparent resistance of groundnut cultivar Robut 33-1 to bud necrosis disease. *Plant Dis.* **69**, 718–719.

Ammar, E.D. (1994). Propagative transmission of plant and animal viruses by insects: Factors affecting vector specificity and competence. *Adv. Dis. Vector Res.* **10**, 289–359.

Ammar, E.D., Jarlfors, U. and Pirone, T.P. (1994). Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining of the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. *Phytopathology* **84**, 1054–1060.

Anagnostou, K., Jahn, M. and Perl-Treves, R. (2000). Inheritance and linkage analysis of resistance to zucchini yellow mosaic virus, papaya ringspot virus and powdery mildew in melon. *Euphytica* **116**, 265–270.

Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X. *et al.* (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13079–13084.

Anderer, F.A. (1959). Reversible Denaturierung des Proteins aus Tabakmosaikvirus. *Z. Naturforsch. B: Anorg. Chem., Org. Chem., Biochem., Biophys., Biol.* **14**, 642–647.

Anderer, F.A., Uhlig, H., Weber, E. and Schramm, G. (1960). Primary structure of the protein of tobacco mosaic virus. *Nature (London)* **186**, 922–925.

Anderson, E.J., Stark, D.M., Nelson, R.S., Powell, P.A., Tumer, N.E. and Beachy, R.N. (1989). Transgenic plants that express the coat protein genes of tobacco mosaic virus or alfalfa mosaic virus interfere with disease development of some nonrelated viruses. *Phytopathology* **79**, 1284–1290.

Anderson, E.J., Kline, A.S., Morelock, T.E. and McNew, R.W. (1996). Tolerance to blackeye cowpea mosaic potyvirus not correlated with decreased virus accumulation or protection from cowpea stunt disease. *Plant Dis.* **80**, 847–852.

Anderson, M.L.M. and Young, B.D. (1985). Quantitative filter hybridization. In: B.D. Hames and S.J. Higgins (eds) *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, pp. 73–111. IRL Press, Oxford.

Andrews, J.H. and Shalla, T.A. (1974). The origin, development and conformation of amorphous inclusion body components in tobacco etch virus-infected cells. *Phytopathology* **64**, 1234–1243.

Andrianifahanana, M., Lovins, K., Dute, R., Sikora, E. and Murphy, J.F. (1997). Pathway for phloem-dependent movement of pepper mottle potyvirus in the stem of *Capsicum annuum*. *Phytopathology* **87**, 892–898.

Andriessen, M., Meulewaeter, F. and Cornelissen, M. (1995). Expression of tobacco necrosis virus open reading frames 1 and 2 is sufficient for the replication of satellite tobacco necrosis virus. *Virology* **212**, 222–224.

Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223–230.

Angell, S.M., Davies, C. and Baulcombe, D.C. (1996). Cell-to-cell movement of potato virus X is associated with a change in the size-exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana clevelandii*. *Virology* **216**, 197–201.

Angenent, G.C., Linthorst, H.J.M., van Belkum, A.F., Cornelissen, B.J.C. and Bol, J.F. (1986). RNA2 of tobacco rattle virus strain TCM encodes an unexpected gene. *Nucl. Acids Res.* **14**, 4673–4682.

Angenent, G.C., Verbeek, H.B.M. and Bol, J.F. (1989a). Expression of the 16K cistron of tobacco rattle virus in protoplasts. *Virology* **169**, 305–311.

Angenent, G.C., Posthumus, E., Brederode, F.T. and Bol, J.F. (1989b). Genome structure of tobacco rattle virus strain PLB: further evidence on the occurrence of RNA recombination among tobraviruses. *Virology* **171**, 271–274.

Angenent, G.C., Posthumus, E. and Bol, J.F. (1989c). Biological activity of transcripts synthesised *in vitro* from full-length and mutated DNA copies of tobacco rattle virus RNA2. *Virology* **173**, 68–76.

Angenent, G.C., van den Ouweland, J.M.W. and Bol, J.F. (1990). Susceptibility to virus infection of transgenic tobacco plants expression structural and non-structural genes of tobacco rattle virus. *Virology* **175**, 191–198.

Anjaneyulu, A. and Bhaktavatsalam, G. (1987). Evaluation of synthetic pyrethroid insecticides for tungro management. *Trop. Pest Manag.* **33**, 323–326.

Anjaneyulu, A., Satapathy, M.K and Shukla, V.D. (1994). *Rice Tungro*. Oxford and IHB Publishing, New Delhi.

Ansel-McKinney, P. and Gehrke, L. (1998). RNA determinants of a specific RNA-coat protein peptide interaction in alfalfa mosaic virus: conservation of homologous features in ilarvirus RNAs. *J. Mol. Biol.* **278**, 767–785.

Ansel-McKinney, P., Scott, S.W., Swanson, M., Ge, X. and Gehrke, L. (1996). A plant viral coat protein RNA binding consensus sequence contains a crucial arginine. *EMBO J.* **15**, 5077–5084.

Antignus, Y., Sela, I. and Harpaz, I. (1971). Species of RNA extracted from tobacco and *Datura* plants and their differential sensitivity to actinomycin D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 78–88.

Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S. and van Loon, L.C. (1980). Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J. Gen. Virol.* **47**, 79–87.

Anton-Lamprecht, I. (1966). Beitrage zum Problem der Plastidenabiinderung: III. Über das Vorkomnien von 'Rückmutationen' in einer spontanentstandenen Plastidenschecke von Epilobium hirsutum. *Z. Pflanzenphysiol.* **54**, 417–445.

Anzola, J.V., Xu, Z., Asamizu, T. and Nuss, D.L. (1987). Segment-specific inverted repeats found adjacent to conserved terminal sequences in wound tumor virus genome and defective interfering RNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 8301–8305.

Aoki, S. and Takebe, I. (1969). Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *Virology* **39**, 439–448.

Aoki, S. and Takebe, I. (1975). Replication of tobacco mosaic virus RNA in tobacco mesophyll protoplasts *in vitro*. *Virology* **65**, 343–354.

Aparicio, F., Sánchez-Pina, M.A., Sánchez-Navarro, J.A. and Pallás, V. (1999). Location of prunus necrotic ringspot ilarvirus within pollen grains of infected nectarine trees: evidence from RT-PCR, dot-blot and *in situ* hybridisation. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**, 623–627.

Appiano, A. and D'Agostino, G. (1983). Distribution of tomato bushy stunt virus in root tips of systemically infected *Gomphrena globosa*. *J. Ultrastruct. Res.* **85**, 239–248.

Appiano, A. and Pennazio, S. (1972). Electron microscopy of potato meristem tips infected with potato virus X. *J. Gen. Virol.* **14**, 273–276.

Appiano, A., Pennazio, S., D'Agostino, G. and Redolfi, P. (1977). Fine structure of necrotic local lesions induced by tomato bushy stunt virus *Gomphrena globosa* leaves. *Physiol. Plant Pathol.* **11**, 327–332.

Aranda, M. and Maule, A. (1998). Virus-induced host gene shutoff in animals and plants. *Virology* **243**, 261–267.

Aranda, M., Escaler, M., Wang, D. and Maule, A.J. (1996). Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 15289–15293.

Aranda, M.A., Fraile, A., Dopazo, J., Malpica, J.M. and García-Arenal, F. (1997). Contribution of mutation and RNA recombination to the evolution of a plant pathogenic RNA. *J. Mol. Evol.* **44**, 81–88.

Aranda, M.A., Escaler, M., Thomas, C.L. and Maule, A.J. (1999). A heat shock transcription factor in pea is differentially controlled by heat and virus replication. *Plant J.* **20**, 153–161.

Araya, J.E. and Foster, J.E. (1987). Laboratory study on the effects of barley yellow dwarf virus on the life cycle of *Rhopalosiphum padi* (L). *J. Plant Dis. Prot.* **94**, 578–583.

Arce-Johnson, P., Reimann-Philipp, U., Padgett, H.S., Rivera-Bustamante, R. and Beachy, R.N. (1997). Requirement of the movement protein for long distance spread of tobacco mosaic virus in grafted plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 691–699.

Argos, P. (1981). Secondary structure prediction of plant virus coat proteins. *Virology* **110**, 55–62.

Argos, P. (1988). A sequence motif in many polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**, 9909–9916.

Argos, P., Kamer, G., Nicklin, M.J.H. and Wimmer, E. (1984). Similarity in gene organization and homology between proteins of animal picornaviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families. *Nucl. Acids Res.* **12**, 7251–7267.

Arguello-Astorga, G.R., Guevara-Gonzalez, R.G., Herrera-Estrella, L.R. and Rivera-Bustamante, R.F. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* **203**, 90–100.

Armour, S.L., Melcher, U., Pirone, T.P., Lyttle, D.J. and Essenberg, R.C. (1983). Helper component for aphid transmission encoded by region II of cauliflower mosaic virus DNA. *Virology* **129**, 25–30.

Aronson, M.N., Meyer, A.D., Györgvey, J. *et al.* (2000). Clink, a nanovirus-encoded protein, binds both pRB and SKP1. *J. Virol.* **74**, 2967–2972.

Asamizu, T., Summers, D., Motika, M.B., Anzola, J.V. and Nuss, D.L. (1985). Molecular cloning and characterization of the genome of wound turnout virus: a tumor-inducing plant reovirus. *Virology* **144**, 398–409.

Ashby, J.W., Teh, P.B. and Close, R.C. (1979). Symptomatology of subterranean clover red leaf virus and its incidence in some legume crops, weed hosts and certain alate aphids in Canterbury, New Zealand. *N. Z. J. Agric. Res.* **22**, 361–365.

Asher, M. (1999). Sugar-beet rhizomania: the spread of a soilborne disease. *Microbiol. Today* **26**, 120–122.

Ashoub, A., Rohde, W. and Prufer, D. (1998). In planta transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. *Nucl. Acids Res.* **26**, 420–426.

Asjes, C.J. (1978). Minerale oliën op lelies om virusverspreiding tegen te gaan. *Bloembollencultuur* **88**, 1046–1047.

Asjes, C.J. (1980). Toepassing van minerale olie om verspreiding van hyacintemozaiekvirus in hyacinten tegen te gaan. *Bloembolienculťuur* **90**, 1396–1397.

Asjes, C.J., de Vos, P. and von Slogteren, D.H.M. (1973). Brown ring formation and streak mottle, two distinct syndromes in lilies associated with complex infections of lily symptomless virus and tulip breaking virus. *Neth. J. Plant Pathol.* **79**, 23–35.

Assad, F.F. and Signer, E.R. (1990). Cauliflower mosaic virus P35S promoter activity in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **223**, 517–520.

Asselin, A. and Zaitlin, M. (1978). An anomalous form of tobacco mosaic virus RNA observed upon polyacrylamide gel electrophoresis. *Virology* **88**, 191–193.

Astruc, N., Marcos, J.F., Macquaire, G., Candresse, T. and Pallas, V. (1996). Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**, 837–846.

Atabekov, J.G. (1975). Host specificity of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **13**, 127–145.

Atabekov, J.G. and Dorokhov, Yu.L. (1984). Plant virus-specific transport function and resistance of plants to viruses. *Adv. Virus Res.* **29**, 313–364.

Atabekov, J.G., Novikov, V.K., Vishnichenko, V.K. and Javakhia, V.G. (1970a). A study of the mechanisms controlling the host range of plant viruses: II. The host range of hybrid viruses reconstituted *in vitro*, and of free viral RNA. *Virology* **41**, 108–115.

Atabekov, J.G., Schaskolskaya, N.D., Atabekova, T.I. and Sacharovskaya, G.A. (1970b). Reproduction of temperature-sensitive strains of TMV under restrictive conditions in the presence of temperature-resistant helper strain. *Virology* **41**, 397–407.

Atabekov, J.G., Dorokhov, Yu.L. and Taliansky, M.E. (1983). A virus-coded function responsible for the transport of virus genome from infected to healthy cells. *Tag. ungs ber.—Akad. Landwirtschafts wiss. DDR* **216**, 53–58.

Atabekov, J.G., Malyshenko, S.I., Morozov, S.Yu. *et al.* (1999). Identification and study of tobacco mosaic virus movement function by complementation tests. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **354**, 629–635.

Atabekova, T.I., Taliansky, M.E. and Atabekov, J.G. (1975). Specificity of protein–RNA and protein–protein interaction upon assembly of TMV *in vivo* and *in vitro*. *Virology* **67**, 1–13.

Atchison, B.A. (1973). Division, expansion and DNA synthesis in meristematic cells of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) root-tips invaded by tobacco ringspot virus. *Physiol. Plant Pathol.* **3**, 1–8.

Athow, K.L. and Bancroft, J.B. (1959). Development and transmission of tobacco ringspot virus in soybean. *Phytopathology* **49**, 697–701.

Athow, K.L. and Laviolette, F.A. (1962). Relation of seed position and pod location to tobacco ringspot virus seed transmission in soybean. *Phytopathology* **52**, 714–715.

Atiri, G.I. (1984). The occurrence and importance of okra mosaic virus in Nigerian weeds. *Ann. Appl. Biol.* **104**, 261–265.

Atiri, G.I., Ekpo, E.J.A. and Thottappilly, G. (1984). The effect of aphid-resistance in cowpea on infestation and development of *Aphis craccivora* and the transmission of cowpea aphid-borne mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* **104**, 339–346.

Atkins, D., Roberts, K., Hull, R. and Bishop, D.H.L. (1991a). Expression of tobacco mosaic virus movement protein using a baculovirus expression vector. *J. Gen. Virol.* **72**, 2831–2835.

Atkins, D., Hull, R., Wells, B., Roberts, K., Moore, P. and Beachy, R.N. (1991b). The tobacco mosaic virus movement protein in transgenic plants is localised to plasmodesmata. *J. Gen. Virol.* **72**, 209–211.

Atkinson, P.H. and Matthews, R.E.F. (1970). On the origin of dark green tissue in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**, 344–356.

Atkinson, T.G. and Grant, M.N. (1967). An evaluation of streak mosaic losses in winter wheat. *Phytopathology* **57**, 188–192.

Atkinson, T.G. and Slykhuis, J.T. (1963). Relation of spring drought, summer rains and high fall temperatures to the wheat streak mosaic epiphytotic in southern Alberta, 1963. *Can. Plant Dis. Surv.* **43**, 154–159.

Atreya, C.D. and Siegel, A. (1989). Localization of multiple TMV encapsulation initiation sites in rbcL gene transcripts. *Virology* **168**, 388–392.

Atreya, C.D., Atreya, P.L., Thornbury, D.W. and Pirone, T.P. (1992). Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology* **191**, 106–111.

Audy, P., Palukaitis, P., Slack, S.A. and Zaitlin, M. (1994). Replicase-mediated resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants. *Mol. Plant Microb. Interact.* **7**, 15–22.

Austin, R.B., Ford, M.A., Edrich, J.A. and Hooper, B.E. (1976). Some effects of leaf posture on photosynthesis and yield in wheat. *Ann. Appl. Biol.* **83**, 425–446.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E. *et al.* (eds) (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1. Wiley, New York.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E. *et al.* (eds) (1988). *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2. Wiley, New York.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E. *et al.* (eds) (1998). *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols 1 and 2. John Wiley, New York.

Avila-Rincon, M.J., Collmer, C.W. and Kaper, J.M. (1986). In vitro translation of cucumoviral satellites. I. Purification and nucleotide sequence of cucumber mosaic virus-associated RNA5 from cucumber mosaic virus strain S. Virology 152, 446–454.

Ayala, F.J. (1999). Molecular clock mirages. *Bioessays* **21**, 71–75.

Azzam, O., Frazer, J., Delarosa, D., Beaver, J.S., Ahlquist, P. and Maxwell, D.P. (1994). Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* **204**, 289–296.

Babos, P. and Shearer, G.B. (1969). RNA synthesis in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* **39**, 286–295.

Backus, E.A. (1994). History, development and applications of the AC electronic monitoring system for insect feeding. In: M.M. Ellsbury, E.A. Backus and D.E. Ullman (eds) *History, Development and Application of AC Electronic Feeding Monitors*, pp. 1–51. Entomological Society of America, Lanham, Maryland.

Backus, R.C. and Williams, R.C. (1950). Use of spraying methods and of volatile suspending media in the preparation of specimens for electron microscopy. *J. Appl. Physiol.* **21**, 11–15.

Baer, M., Houser, F., Loesch-Fries, L.S. and Gehrke, L. (1994). Specific RNA binding by amino-terminal peptides of alfalfa mosaic virus coat protein. *EMBO J.* **13**, 727–735.

Bagnall, R.H. (1988). Epidemics of potato leaf roll in North America and Europe linked to drought and sunspot cycles. *Can. J. Plant. Pathol.* **10**, 193–202.

Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. and Dinesh-Kumar, S.P. (1997). Signaling in plant–microbe interactions. *Science* **276**, 726-733.

Baker, P.F. (1960). Aphid behaviour on healthy and on yellow virus-infected sugar beet. *Ann. Appl. Biol.* **48**, 384–391.

Balachandran, S., Hurry, V.M., Kelley, S.E. *et al.* (1997). Concepts of biotic stress: some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiol. Plant* **100**, 203–213.

Balasaraswathi, R., Sadasivam, S., Ward, M. and Walker, J.M. (1998). An antiviral protein from *Bougainvillea spectabilis* roots: purification and characterization. *Phytochemistry* **47**, 1561–1565.

Balázs, E. (1990). Disease symptoms in transgenic tobacco induced by integrated gene VI of cauliflower mosaic virus. *Virus Genes* **3**, 205–211.

Balázs, E., Gáborjányi, R. and Kirdly, Z. (1973). Leaf senescence and increased virus susceptibility in tobacco. The effect of abscisic acid. *Physiol. Plant Pathol.* **3**, 341–346.

Balázs, E., Sziráki, I. and Király, Z. (1977). The role of cytokinins in the systemic acquired resistance of tobacco hypersensitive to tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* **11**, 29–37.

Balázs, E., Bouzoubaa, S., Guilley, H., Jenard, G., Paszkowski, J. and Richards, K. (1985). Chimeric vector construction for higher plant transformation. *Gene* **40**, 343–348.

Bald, J.G. (1964). Cytological evidence for the replication of plant virus nucleic acid in the nucleus. *Virology* **22**, 377–387.

Bald, J.G. and Tinsley, T.W. (1967). A quasi-genetic model for plant virus host ranges: III. Congruence and relatedness. *Virology* **32**, 328–336.

Bald, J.G. and Tinsley, T.W. (1970). A quasi-genetic model for plant virus host ranges: IV. Cacao swollen-shoot and mottle-leaf viruses. *Virology* **40**, 369–378.

Balint, R. and Cohen, S.S. (1985a). The incorporation of radiolabelled polyamines and methionine into turnip yellow mosaic virus in protoplasts from infected plants. *Virology* **144**, 181–193.

Balint, R. and Cohen, S.S. (1985b). The effects of dicyclohexylamine on polyamine biosynthesis and incorporation into turnip yellow mosaic virus in chinese cabbage protoplasts infected *in vitro*. *Virology* **144**, 194–203.

Ball, E.M. (1973). Solid phase radioimmunoassay for plant viruses. *Virology* **55**, 516–520.

Ballas, N., Shimson, B., Hermona, S. and Abraham, L. (1989). Efficient functioning of plant promoters and polyadenylation sites in *Xenopus* oocytes. *Nucl. Acids Res.* **17**, 7891–7904.

Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* **35**, 235–241.

Baluška, F., Volkmann, D. and Barlow, P.W. (2001). Mobile plant cell body: a 'bug' within a 'cage'. *Trends Plant Sci.* **6**, 104–111.

Ban, N. and McPherson, A. (1995). The structure of satellite panicum mosaic virus at 1.9 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 882–890.

Ban, N., Larson, S.B. and McPherson, A. (1995). Structural comparisons of the plant satellite viruses. *Virology* **214**, 571–583.

Bancroft, J.B. (1972). A virus made from parts of the genomes of brome mosaic and cowpea chlorotic mottle viruses. *J. Gen. Virol.* **14**, 223–228.

Bancroft, J.B. and Horne, R.W. (1977). Bromoviruses (brome mosaic virus) group. In: K. Maramorosch (ed.) *The Atlas of Insect and Plant Viruses*, pp. 287–302. Academic Press, New York.

Bancroft, J.B. and Pound, G.S. (1954). Effect of air temperature on the multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco. *Phytopathology* **44**, 481–482.

Bancroft, J.B., McLean, J.D., Rees, M.W. and Short. M.N. (1971). The effect of an arginyl to a cysteinyl replacement on the uncoating behaviour of a spherical plant virus. *Virology* **45**, 707–715.

Bandla, M.D., Campbell, L.R., Ullman, D.E. and Sherwood, J.L. (1998). Interaction of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. *Phytopathology* **88**, 98–104.

Banerjee, N., Wang, J.-Y. and Zaitlin, M. (1995). A single nucleotide change in the coat protein gene of tobacco mosaic virus is involved in the induction of severe chlorosis. *Virology* **207**, 234–239.

Banttari, E.E. and Goodwin, P.H. (1985). Detection of potato viruses S, X and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitro-cellulose membranes (Dot-ELISA). *Plant Dis.* **69**, 202–205.

Banttari, E.E. and Zeyen, R.J. (1969). Chromatographic purification of the oat blue dwarf virus. *Phytopathology* **59**, 183–186.

Banttari, E.E. and Zeyen, R.J. (1972). Ultrastructure of flax with a simultaneous virus and mycoplasma-like infection. *Virology* **49**, 305–308.

Bao, Y. (1994). Replication intermediates of rice tungro bacilliform virus DNA support a replication mechanism involving reverse transcription. *Virology* **204**, 626–633.

Bao, Y. and Hull, R. (1992). Characterization of the discontinuities in rice tungro bacilliform virus DNA. *J. Gen. Virol.* **73**, 1297–1301.

Bao, Y. and Hull, R. (1993a). Mapping the 5′ terminus of rice tungro bacilliform viral genomic RNA. *Virology* **197**, 445–448.

Bao, Y. and Hull, R. (1993b). A strong-stop DNA in rice plants infected with rice tungro bacilliform virus. *J. Gen. Virol.* **74**, 1611–1616.

Bao, Y. and Hull, R. (1994). Replication intermediates of rice tungro bacilliform virus DNA support a replication mechanism involving reverse transcription. *Virology* **204**, 626–633.

Baratova, L.A., Grebenshcikov, N.I., Dobrov, E.N. *et al.* (1992). The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building. *Virology* **188**, 175–180.

Barbara, D.J. and Clark, M.F. (1982). A simple indirect ELISA using $F(ab')_2$ fragments of immunoglobulin. *J. Gen. Virol.* **58**, 315–322.

Barbara, D.J., Kawata, E.E., Ueng, P.P., Lister, R.M. and Larkins, B.A. (1987). Production of cDNA clones from the MAV isolate of barley yellow dwarf virus. *J. Gen. Virol.* **68**, 2419–2427.

Barbara, D.J., Morton, A. and Adams, A.N. (1990). Assessment of UK hops for the occurrence of hop latent and hop stunt viroids. *Ann. Appl. Biol.* **116**, 265–272.

Bar-Joseph, M and Hull, R. (1974). Purification and partial characterization of sugar beet yellows virus. *Virology* **62**, 552–562.

Bar-Joseph, M., Rosner, A., Moscovitz, M. and Hull, R. (1983). A simple procedure for the extraction of double-stranded RNA from infected plants. *J. Virol. Methods* **6**, 1–8.

Bar-Joseph, M., Segev, D., Blickle, V., Yesodi, V., Franck, A. and Rosner, A. (1986). Application of synthetic DNA probes for the detection of viroids and viruses. In: R.A.C. Jones and L. Torrance (eds) *Developments and Applications in Virus Testing*, Dev. Appl. Biol. I, pp. 13–23. Association of Applied Biologists, Wellesbourne.

Bar-Joseph, M., Yanmg, G., Gafney, R. and Mawassi, M. (1997). Subgenomic RNAs: the possible building blocks for modular recombination of *Closteroviridae* genomes. *Sem. Virol.* **8**, 113–119.

Barker, H. (1989). Specificity of the effect of sap-transmissible viruses in increasing the accumulation of luteoviruses in co-infected plants. *Ann. Appl. Biol.* **115**, 71–78.

Barker, H. and Harrison, B.D. (1978). Double infection, interference and superinfection in protoplasts exposed to two strains of raspberry ringspot virus. *J. Gen. Virol.* **40**, 647–658.

Barker, H. and Harrison, B.D. (1986). Restricted distribution of potato leafroll virus antigen in resistant potato genotypes and its effect on transmission of the virus by aphids. *Ann. Appl. Biol.* **109**, 595–604.

Barker, H. and Waterhouse, P.M. (1999). The development of resistance to luteoviruses mediated by host genes and pathogen-derived transgenes. In: H.G. Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp. 169–210. CAB International, Wallingford, UK.

Barker, H. and Woodford, J.A.T. (1987). Unusually mild symptoms of potato leafroll virus in the progeny of late-infected mother plants. *Potato Res.* **30**, 345–348.

Barker, H., Reavy, B., McGeachy, K.D. and Dawson, S. (1998). Transformation of *Nicotiana benthamiana* with potato mop-top virus coat protein gene produces a novel phenotype mediated by the coat protein. *Mol. Plant Microb. Interact.* **11**, 626–633.

Barker, K.R. and Koenning, S.R. (1998). Developing sustainable systems for nematode management. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 165–205.

Barker, R.F., Jarvis, N.P., Thompson, D.V., Loesch-Fries, L.S. and Hall, T.C. (1983). Complete nucleotide sequence of alfalfa mosaic virus RNA3. *Nucl. Acids Res.* **11**, 2881–2891.

Barlow, D.J., Edwards, M.S. and Thornton, J.M. (1986). Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature (Lond.)* **322**, 747–752.

Barnes, J.M., Trinidad-Correa, R., Orum, T.V., Felix-Gastelum, R. and Nelson, M.R. (1999). Landscape ecology as a new infrastructure for improving management of plant viruses and their insect vectors in agroecosystems. *Ecosystem Health* **5**, 26–35.

Barnett, O.W. and Fulton, R.W. (1971). Differential response of *Prunus* necrotic ringspot and tulare apple mosaic viruses to stabilizing agents. *Virology* **46**, 613–619.

Barr, K.J. and Asher, M.J.C. (1996). Studies on the life-cycle of *Polymyxa betae* in sugar beet roots. *Mycol. Res.* **100**, 203–208.

Bartels, R. (1954). Serologische Untersuchungen über das Verhalten des Kartoffel-A-virus in Tabakpflanzen. *Phytopathol. Z.* **21**, 395–406.

Bass, B.L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* **101**, 235–238.

Bassell, G. and Singer, R.H. (1997). MRNA and cytoskeleton filaments. *Curr. Opin.Cell Biol.* **9**, 109–115.

Bassell, G.J., Powers, C.M., Taneja, K.L. and Singer, R.H. (1994a). Single mRNAs visualized on ultrastructural *in situ* hybridization are principally localized at actin filament intersections in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **126**, 863–876.

Bassell, G.J., Singer, R.H. and Kosik, K.S. (1994b). Association of poly(A) mRNA with microtubules in cultured neurons. *Neuron* **12**, 571–582.

Bassi, M. and Favali, M.A. (1972). Electron microscopy of maize rough dwarf virus assembly sites in maize: cytochemical and autoradiographic observations. *J. Gen. Virol.* **16**, 153–160.

Bassi, M., Favali, M.A. and Conti, G.G. (1974). Cell wall protrusions induced by cauliflower mosaic virus in Chinese cabbage leaves: a cytotechnical and autoradiographic study. *Virology* **60**, 353–358.

Bassi, M., Appiano, A., Barbieri, N. and D'Agostino, G. (1985). Chloroplast alterations induced by tomato bushy stunt virus in *Datura* leaves. *Protoplasma* **126**, 233–235.

Bastin, M. and Kaesberg, P. (1975). Radioactive labelling of brome mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **26**, 321–325.

Bath, J.E. and Tsai, J.H. (1969). The use of aphids to separate two strains of pea enation mosaic virus. *Phytopathology* **59**, 1377–1380.

Baughman, G.A., Jacobs, J.D. and Howell, S.H. (1988). Cauliflower mosaic virus gene VI produces a symptomatic phenotype in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 733–737.

Baulcombe, D.C. (1994). Novel strategies for engineering virus resistance in plants *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 117–124.

Baulcombe, D.C. (1996a). Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**, 1833–1844.

Baulcombe, D.C. (1996b). RNA as a target and initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **32**, 79–88.

Baulcombe, D.C. (1999a). Viruses and gene silencing in plants. *Arch. Virol.* **15** (Suppl.), 189–201.

Baulcombe, D.C. (1999b). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 109–113.

Baulcombe, D.C. (2000). Unwinding RNA silencing. *Science* **290**, 1108–1109.

Baulcombe, D.C., Saunders, G.R., Bevan, M.W., Mayo, M.A. and Harrison, B.D. (1986). Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature (Lond.)* **321**, 446–449.

Baulcombe, D.C., Chapman, S. and Santa Cruz, S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* **7**, 1045–1053.

Baum, M. and Beier, H. (1998). Wheat cytoplasmic arginine tRNA isoacceptor with a U*CG anticodon is an efficient UGA suppressor *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* **26**, 1390–1395.

Baur, E. (1904). Zur Aetiologie der infectiösen Panachierung. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **22**, 453–460.

Bawden, F.C. (1964). *Plant Viruses and Virus Diseases*, 4th edn. Ronald Press, New York.

Bawden, F.C. and Kassanis, B. (1950). Some effects of host nutrition on the susceptibility of plants to infection by certain viruses. *Ann. Appl. Biol.* **37**, 46–57.

Bawden, F.C. and Pirie, N.W. (1936). Experiments on the chemical behaviour of potato virus X. *Br. J. Exp. Pathol.* **17**, 64–74.

Bawden, F.C. and Pirie, N.W. (1937). The isolation and some properties of liquid crystalline substances from solanaceous plants infected with three strains of tobacco mosaic virus. *Proc. R. Soc. London B* **123**, 274–320.

Bawden, F.C. and Pirie, N.W. (1956). Observations on the anomalous proteins occurring in extracts of plants infected with strains of tobacco mosaic virus. *J. Gen. Microbiol.* **14**, 460–477.

Bawden, F.C. and Roberts, F.M. (1947). The influence of light intensity on the susceptibility of plants to certain viruses. *Ann. Appl. Biol.* **34**, 286–296.

Bawden, F.C., Pirie, N.W., Bernal, J.D., and Fankuchen, I. (1936). Liquid crystalline substances from virus-infected plants. *Nature (London)* **138**, 1051–1052.

Bayer, M.E. and Bocharov, A.F. (1973). The capsid structure of bacteriophage lambda. *Virology* **54**, 465–475.

Beachy, R.N. (1993). Transgenic resistance to plant viruses. *Semin. Virol.* **4**, 327–416.

Beachy, R.N. (1997). Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Curr. Topics Biotechnol.* **8**, 215–220.

Beachy, R.N. (1999). Coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery, mechanisms and exploitation. *Phil Trans. R. Soc. Lond. B* **354**, 659–664.

Beachy, R.N. and Zaitlin, M. (1975). Replication of tobacco mosaic virus: VI. Replicative intermediate and TMV–RNA-related RNAs associated with polyribosomes. *Virology* **63**, 84–97.

Beachy, R.N. and Zaitlin, M. (1977). Characterization and *in vitro* translation of the RNAs from less-than-full-length, virus-related, nucleoprotein rods present in tobacco mosaic vines preparations. *Virology* **81**, 160–169.

Beachy, R.N., Abel, P., Oliver, M.J. *et al.* (1986). Potential for applying genetic information to studies of virus pathogenesis and cross-protection. In: M. Zaitlin, P. Day and A. Hollaender (eds) *Biotechnology in Plant Science: Relevance to Agriculture in the Eighties*, pp. 265–275. Academic Press, Orlando, FL.

Beachy, R.N., Abel, P.P., Nelson, R.S. *et al.* (1996). Expression of genes encoding TMV coat protein and 30-kDa protein in transformed plants. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **10C**, 38.

Beale, H.P. (1928). Immunologic reactions with tobacco mosaic virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **25**, 602.

Beator, J. and Kloppstech, K. (1996). Significance of circadian gene expression in higher plants. *Chronobiol. Int.* **13**, 319–339.

Beck, D.L. and Dawson, W.O. (1990). Deletion of repeated sequences from tobacco mosaic virus mutants with two coat protein genes. *Virology* **177**, 462–469.

Beck, D.L., van Dolleweerd, C.J., Lough, T.J. *et al.* (1994). Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 10310–10314.

Béclin, C., Berthomé, R., Palauqui, J.-C., Tepfer, M. and Vaucheret, H. (1998). Infection of tobacco and *Arabidopsis* plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. *Virology* **252**, 313–317.

Beczner, L., Horváth, J., Romhanyi, J. and Förster, H. (1984). Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Res.* **27**, 339–352.

Bedbrook, J.R. (1972). The effects of TYMV infection on photosynthetic carbon metabolism. MSc thesis, University of Auckland, New Zealand.

Bedbrook, J.R. and Matthews, R.E.F. (1973). Changes in the flow of early products of photosynthetic carbon fixation associated with the replication of TYMV. *Virology* **53**, 84–91.

Bedbrook, J.R. and Matthews, R.E.F. (1976). Location, rate and asymmetry of ds-RNA synthesis during replication of TYMV in Chinese cabbage. *Ann. Microbiol. (Paris)* **127A**, 55–60.

Bedbrook, J.R., Douglas, J., and Matthews, R.E.F. (1974). Evidence for TYMV-induced RNA and DNA synthesis in the nuclear fraction from infected Chinese cabbage leaves. *Virology* **58**, 334–344.

Beemster, A.B.R. (1966). The rate of infection of potato tubers with potato virus YN in relation to position of the inoculated leaf. In: A.B.R. Beemster and J. Dijkstra (eds) *Viruses of Plants*, pp. 44–47. North-Holland, Amsterdam.

Beemster, A.B.R. (1967). Partial infection with potato virus YN of tubers from primarily infected potato plants. *Neth. J. Plant Pathol.* **73**, 161–164.

Beemster, A.B.R. (1979). Acquisition of potato virus YN by *Myzus persicae* from primarily infected 'Bintje' potato plants. *Neth. J. Plant Pathol.* **85**, 75–81.

Beer, S.V. and Kosuge, T. (1970). Spermidine and spermine: polyamine components of turnip yellow mosaic virus. *Virology* **40**, 930–938.

Beetham, P.R., Hafner, G.J., Harding, R.M and Dale, J.L. (1997). Two mRNAs are transcribed from banana bunchy top virus DNA-1. *J. Gen. Virol.* **78**, 229–236.

Beffa, R.S., Hofer, R.-M., Thomas, M. and Meins, F., Jr. (1996). Decrease susceptibility to viral disease of β-1,3-gluconase-deficient plants generated by antisense transformation. *Plant Cell* **8**, 1001–1011.

Beier, H. and Bruening, G. (1975). The use of an abrasive in the isolation of cowpea leaf protoplasts which support the multiplication of cowpea mosaic virus. *Virology* **64**, 272–276.

Beier, H. and Bruening, G. (1976). Factors influencing the infection of cowpea protoplasts by cowpea mosaic virus RNA. *Virology* **72**, 363–369.

Beier, H., Siler, D.J., Russell, M.L. and Bruening, G. (1977). Survey of susceptibility to cowpea mosaic virus among protoplasts and intact plants from *Vigna sinensis* lines. *Phytopathology* **67**, 917–921.

Beier, H., Mundry, K.W. and Issinger, O.-G. (1980). *In vivo* and *in vitro* translation of the RNAs of four tobamoviruses. *Intervirology* **14**, 292–299.

Beier, H., Barciszewska, M., Krupp, G., Mitnacht, R. and Gross, H.J. (1984a). UAG readthrough during TMV RNA translation: Isolation and sequence of two $tRNAs^{tyr}$ with suppressor activity from tobacco plants. *EMBO J.* **3**, 351–356.

Beier, H., Barciszewska, M. and Sickinger, H.-D. (1984b). The molecular basis for the differential translation of TMV RNA in tobacco protoplasts and wheat germ extracts. *EMBO J.* **3**, 1091–1096.

Beijerinck, M.W. (1898). Over een contagium vivum fluidum als oorzaak van de vlekziekte der tabaksbladen. *Versl. Gewone Vergad. Wis. Natuurkd. Afd., K. Akad. Wet. Amsterdam* **7**, 229–235.

Bejarano, E.R., Khashoggi, A., Witty, M. and Lichtenstein, C. (1996). Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 759–764.

Belin, C., Schmitt, C., Gaire, F., Walter, B., Demangeat, G. and Pinck, L. (1999). The nine-C-terminal residues of the grapevine fanleaf nepovirus movement protein are critical for systemic virus spread. *J. Gen. Virol.* **80**, 1347–1356.

Belsham, G.J. and Lomonossoff, G.P. (1991). The mechanism of translation of cowpea mosaic virus middle component RNA: no evidence for internal initiation from experiments in an animal cell transient expression system. *J. Gen Virol.* **72**, 3109–3113.

Belsham, G.J. and Sonenberg, N. (1996). RNA-protein interactions in regulation of picornaviral RNA translation. *Microbiol. Rev.* **60**, 499–513.

Benda, G.T.A and Bennett, C.W. (1964). Effect of curly top virus on tobacco seedlings: infection without obvious symptoms. *Virology* **24**, 97–101.

Bendahmane, A., Köhm, B.A., Dedi, C. and Baulcombe, D.C. (1995). The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of *Rx1*-mediated virus resistance in potato. *Plant J.* **8**, 933–941.

Bendahmane, A., Kanyuka, K.V and Baulcombe, D.C. (1997a). High resolution and physical mapping of the *Rx* gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 153–162.

Bendahmane, A., Kanyuka, K. and Baulcombe, D.C. (1999). The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* **11**, 781–791.

Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K. and Baulcombe, D.C. (2000). *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J.* **21**, 73–81.

Bendahmane, M. and Beachy, R.N. (1999). Control of tobamovirus infections via pathogen-derived resistance. *Adv. Virus Res.* **53**, 369–386.

Bendahmane, M. and Gronenborn, B. (1997). Engineering resistance against tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) using antisense RNA. *Plant Mol. Biol.* **33**, 351–357.

Bendahmane, M., Fitchen, J.H., Zang, G.H. and Beachy, R.N. (1997b). Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *J. Virol.* **71**, 7942–7950.

Benfey, P.N. and Chua, N.-H. (1989). Regulated genes in transgenic plants. *Science* **244**, 174–181.

Benfey, P.N. and Chua, N.H. (1990). The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* **250**, 959–966.

Bennett, C.W. (1940a). Relation of food translocation to movement of virus of tobacco mosaic. *J. Agric. Res.* **60**, 361–390.

Bennett, C.W. (1940b). Acquisition and transmission of viruses by dodder (*Cuscuta subinclusa*). *Phytopathology* **30**, 2 (abstract).

Bennett, C.W. (1944). Latent virus of dodder and its effect on sugar beet plants. *Phytopathology* **34**, 77–91.

Bennett, C.W. (1955). Recovery of water pimpernel from curly top and the reaction of recovered plants to reinoculation with different virus strains. *Phytopathology* **45**, 531–536.

Bennett, C.W. (1960). Sugar beet yellows disease in the United States. *US Dep. Agric., Tech. Bull.* **1218**, 1–63.

Bennett, C.W. (1963). Highly virulent strains of curly top virus in sugar beet in western United States. *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* **12**, 515–520.

Bennett, C.W. (1969). Seed transmission of plant viruses. *Adv. Virus Res.* **14**, 221–261.

Ben-Sin, C. and Po, T. (1982). Infection of barley protoplasts with barley stripe mosaic virus detected and assayed by immunoperoxidase. *J. Gen. Virol.* **58**, 323–327.

Bentley, G.A., Lewit-Bentley, A., Liljas, L., Skoglund, U., Roth, M. and Unge, T. (1987). Structure of RNA in satellite tobacco necrosis virus: a low-resolution neutron diffraction study using $H_2O/^2H_2O$ solvent contrast variation. *J. Mol. Biol.* **194**, 129–141.

Berger, P.H. and Toler, R.W. (1983). Quantitative immunoelectrophoresis of panicum mosaic virus and strains of St. Augustine decline. *Phytopathology* **73**, 185–189.

Berger, P.H., Thornbury, D.W. and Pirone, T.P. (1985). Detection of picogram quantities of potyviruses using a dot blot immunobinding assay. *J. Virol. Methods* **12**, 31–39.

Berger, P.H., Barnett, O.W., Brunt, A.A. *et al.* (2000). Family *Potyviridae*. In: M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop *et al.* (eds) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 703–724. Academic Press, San Diego.

Bergstrom, C.T., McElhany, P. and Real, L.A. (1999). Transmission bottlenecks as determinants of virulence in rapidly evolving pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5095–5100.

Bergström, G.C., Johnson, M.C. and Ku , J. (1982). Effects of local infection of cucumber by *Colletotrichum lagenarium*, *Pseudomonas lachrymans* or tobacco necrosis virus on systemic resistance to cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **72**, 922–926.

Berlinger, M.J. and Daban, R. (1987). Breeding for resistance to virus transmission by whiteflies in tomatoes. *Insect Sci. Appl.* **8**, 783–784.

Berna, A., Briand, J.-P., Stussi-Garaud, C. and Godefroy-Colburn, T. (1986). Kinetics of accumulation of the three non-structural proteins of alfalfa mosaic virus in tobacco plants. *J. Gen. Virol.* **67**, 1135–1147.

Bernal, J.D. and Fankuchen, I. (1937). Structure types of protein 'crystals' from virus-infected plants. *Nature (London)* **139**, 923–924.

Bernardi, G. (1971). Chromatography of nucleic acids on hydroxyapatite columns. In: L. Grossman and K. Moldave (eds) *Methods in Enzymology* Vol. 21, Part D, pp. 95–139. Academic Press, New York.

Berrie, L.C., Rybicki, E.P. and Rey, M.E.C. (2001). Complete nucleotide sequence and host range of South African cassava mosaic virus: further evidence for recombination among begomoviruses. *J. Gen. Virol.* **82**, 53–58.

Bertens, P., Wellink, J., Goldbach, R. and van Kammen, A. (2000). Mutational analysis of the cowpea mosaic virus movement protein. *Virology* **267**, 199–208.

Bertioli, D.J., Harris, R.D., Edwards, M.L., Cooper, J.I. and Hawes, W.S. (1991). Transgenic plants and insect cells expressing the coat proteins of arabis mosaic virus produce empty virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **72**, 1801–1809.

Berzal-Herranz, A., de la Cruz, A., Tenllado, F. *et al.* (1995). The *Capsicum* L^3 gene-mediated resistance against tobamoviruses is elicited by the coat protein. *Virology* **209**, 498–505.

Berzofsky, J.A. (1985). Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science* **229**, 932–940.

Best, R.J. (1936). Precipitation of the tobacco mosaic virus complex at its isoelectric point. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **14**, 1–13.

Best, R.J. (1937a). Artificially prepared visible paracrystalline fibres of tobacco mosaic virus nucleoprotein. *Nature (London)* **140**, 547–548.

Best, R.J. (1937b). The quantitative estimation of relative concentrations of the viruses of ordinary and yellow tobacco mosaics and of tomato spotted wilt by the primary lesion method. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **14**, 1–13.

Best, R.J. (1968). Tomato spotted wilt virus. *Adv. Virus Res.* **13**, 65–146.

Best, R.J. and Katekar, G.F. (1964). Lipid in a purified preparation of tomato spotted wilt virus. *Nature (London)* **203**, 671–672.

Bevan, M.W., Mason, S.E. and Goelet, P. (1985). Expression of tobacco mosaic virus coat protein by a cauliflower mosaic virus promoter in plants transformed by *Agrobacterium*. *EMBO J.* **4**, 1921–1926.

Bharadwaj, R.K., Reddy, D.V.R. and Sinha, R.C. (1966). A reinvestigation of the alimentary canal in the leaf-hopper *Agallia constricta* (Homoptera: Cicadellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **59**, 616–617.

Bhargava, K.S. (1951). Some properties of four strains of cucumber mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* **38**, 377–388.

Bhattacharyya-Pakrasi, M., Pen, J., Elmer, J.S. *et al.* (1993). Specificity of a promoter from the rice tngro bacilliform virus for expression in phloem tissues. *Plant* 4, 71–79.

Bhuvaneshwara, M., Subramanya, H.S., Gopinath, K., Savithri, H.S., Nayudu, M.V. and Murthy, M.R.N. (1995). Structure of sesbania mosaic virus at 3 angstrom resolution. *Structure* **3**, 1021–1030.

Bigger, M. (1981). The relative abundance of the mealy bug vectors (Hemiptera, Coccidae and Pseudococcidae) of cocoa swollen shoot disease in Ghana. *Bull. Entomol. Res.* **71**, 435–448.

Bird, L.E., Subramanya, H.S. and Wigley, D.B. (1998). Helicases: a unifying structural theme. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 14–18.

Bisaillon, M. and Lemay, G. (1997). Viral and cellular enzymes involved in the synthesis of mRNA cap structure. *Virology* **238**, 1–7.

Bisaro, D.M. (1994). Recombination in geminiviruses: mechanisms for maintaining genome size and generating genomic diversity. In: J. Paszkowski (ed.) *Homologous Recombination in Plants*, pp. 39–60. Kluwer, Amsterdam.

Bisessar, S. and Temple, P.J. (1977). Reduced ozone injury on virus-infected tobacco in the field. *Plant Dis. Rep.* **61**, 961–963.

Bitterlin, M.W., Gonsalves, D. and Scorza, R. (1987). Improved mechanical transmission of tomato ringspot virus to Prunus seedlings. *Phytopathology* **77**, 560–563.

Bittner, H., Schenk, G. and Schuster, G. (1987). Chemotherapeutical elimination of potato virus X from potato stem cuttings. *J. Phytopathol.* **120**, 90–92.

Black, L.M. (1941). Specific transmission of varieties of potato yellow-dwarf virus by related insects. *Am. Potato J.* **18**, 231–233.

Black, L.M. (1972). Plant tumors of viral origin. *Prog. Exp. Tumor Res.* **15**, 110–137.

Black, L.M. (1984). The controversy regarding multiplication of some plant viruses in their insect vectors. *Curr. Top. Vector Res.* **2**, 1–30.

Blackman, L.M., Boevink, P., Santa Cruz, S., Palukaitis, P. and Oparka, K.J. (1998). The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of *Nicotiana clevelandii*. *Plant Cell* **10**, 525–537.

Blackman, L.M., Harper, J.D.I. and Overall, R.L. (1999). Localization of a centrin-like protein to higher plant plasmodesmata. *Eur. J. Cell Biol.* **78**, 297–304.

Blair, P. (1719). *Botanik Essays.* W.&J. Innys, London.

Blanc, S., Schmidt, I., Kuhl, G. *et al.* (1993a). Paracrystalline structure of cauliflower mosaic virus aphid transmission factor produced both in plants and in a heterologous system and relationship with a solubilized active form. *Virology* **197**, 283–292.

Blanc, S., Cerutti, M., Usmany, M., Vlak, J.M. and Hull, R. (1993b). Biological activity of cauliflower mosaic virus aphid transmission factor expressed in a heterologous system. *Virology* **192**, 643–650.

Blanc, S., Schmidt, I., Vantard, M. *et al.* (1996). A plant virus protein decorates cellular microtubules, yielding a highly stable complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 15158–15163.

Blanc, S. Hébrard, E., Drucker, M. and Froissart, R. (2001). Molecular basis of vector transmission: caulimovirus. In: K. Harris, J.E. Duffus and O.P. Smith (eds) *Virus–Insect–Plant Interactions*. Academic Press, San Diego (in press).

Blanch, E.W., Robinson, D.J., Hecht, L. and Barron, L.D. (2001). A comparison of the solution structures of tobacco rattle and tobacco mosaic viruses from Raman optical activity. *J. Gen. Virol.* **82**, 1499–1502.

Blencowe, J.W. and Tinsley, T.W. (1951). The influence of density of plant population on the incidence of yellows in sugar beet crops. *Ann. Appl. Biol.* **38**, 395–401.

Blok, J., Mackenzie, A., Guy, P. and Gibbs, A. (1987). Nucleotide sequence comparisons of turnip yellow mosaic virus isolates from Australia and Europe. *Arch. Virol.* **97**, 283–295.

Blok, V.C., Ziegler, A., Robinson, D.J. and Murant, A.F. (1994). Sequences of 10 variants of the satleeite-like RNA3 of groundnut rosette virus. *Virology* **202**, 25–32.

Bloomer, A.C., Champness, J.N., Bricogne, G., Staden, R. and Klug, A. (1978). Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 Å resolution showing the interactions within and between subunits. *Nature (London)* **276**, 362–368.

Blum, H., Gross, H.J. and Beier, H. (1989). The expression of the TMV-specific 30-kDa protein in tobacco protoplasts is strongly and selectively enhanced by actinomycin. *Virology* **169**, 51–61.

Blunt, W. (1950). *Tulipomania*. Penguin Books, Harmondsworth, England.

Boag, B. (1985). The localised spread of virus-vector nematodes adhering to farm machinery. *Nematologica* **31**, 234–235.

Boccara, M., Hamilton, W.D.O. and Baulcombe, D.C. (1986). The organisation and interviral homologies of genes at the 3′ end of tobacco rattle virus RNA1. *EMBO J.* **5**, 223–229.

Boccardo, G. and Milne, R.G. (1975). The maize rough dwarf virion: I. Protein composition and distribution of RNA in different viral fractions. *Virology* **68**, 79–85.

Boccardo, G. Hatta, T., Francki, R.I.B. and Grivell, C.J. (1980). Purification and some properties of reovirus-like particles from leafhoppers and their possible involvement in wallaby ear disease of maize. *Virology* **100**, 300–313.

Boccardo, G., Lisa, V., Lusoni, E. and Milne, R.G. (1987). Cryptic plant viruses. *Adv. Virus Res.* **32**, 171–214.

Bockstahler, L.E. (1967). Biophysical studies on double-stranded RNA from turnip yellow mosaic virus-infected plants. *Mol. Gen. Genet.* **100**, 337–348.

Boedtker, H. (1960). Configurational properties of tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *J. Mol. Biol.* **2**, 171–188.

Boege, F., Rohde, W. and Sänger, H.L. (1982). *In vitro* transcription of viroid RNA into full-length copies by RNA-dependent RNA polymerase from healthy tomato leaf tissue. *Biosci. Rep.* **2**, 185–194.

Boevink, P., Chu, P.W.G. and Keese, P. (1995). Sequence of subterranean clover stunt virus DNA: affinities with the geminiviruses. *Virology* **207**, 354–361.

Bol, J.F. (1988). Structure and expression of plant genes encoding pathogenesis related proteins. In: D.P.S. Verina and R.B. Goldberg (eds) *Plant Gene Research*, pp. 201–221. Springer, New York.

Bol, J.F. (1999a). Alfamovirus and Ilarviruses (Bromoviridae). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 38–43 Academic Press, San Diego.

Bol, J.F. (1999b). Alfalfa mosaic virus and ilarviruses: involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. *J. Gen. Virol.* **80**, 1089–1102.

Bol, J.F. and Kruseman, J. (1969). The reversible dissociation of alfalfa mosaic virus. *Virology* **37**, 485–489.

Bol, J.F. and Lak-Kaashoek, M. (1974). Composition of alfalfa mosaic virus nucleoproteins. *Virology* **60**, 476–484.

Bol, J.F. and van Kan, J.A.L. (1988). The synthesis and possible functions of virus-induced proteins in plants. *Microbiol. Sci.* **5**, 47–52.

Bol, J.F. and van Vloten-Doting, L. (1973). Function of top component a RNA in the initiation of infection by alfalfa mosaic virus. *Virology* **51**, 102–108.

Bol, J.F., van Vloten-Doting, L. and Jaspars, E.M.J (1971). A functional equivalence of top component a RNA in the initiation of infection by alfalfa mosaic virus. *Virology* **46**, 73–85.

Bol, J.F., Brederode, F.T., Janze, G.C. and Rauh, D.K. (1975). Studies on sequence homology between the RNAs of alfalfa mosaic virus. *Virology* **65**, 1–15.

Bollen, L.S., Crowley, A., Stodulski, G. and Hau, J. (1996). Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG —a comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *J. Immunol. Methods* **191**, 113–120.

Boller, T. and Meins, F. (eds) (1992). *Genes Involved in Plant Defense.* Springer, Vienna.

Bonfiglioli, R., McFadden, G.I. and Symons, R.H. (1994). *In situ* hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylacoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. *Plant J.* **6**, 99–103.

Bonfiglioli, R., Webb, D.R. and Symons, R.H. (1996). Tissue and intra-cellular distribution of coconut cadang cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by *in situ* hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *Plant J.* **9**, 457–465.

Bonneau, C., Brugidou, C., Chen, L., Beachy, R.N. and Fauquet, C. (1998). Expression of the rice yellow mottle virus P1 protein *in vitro* and *in vivo* and its involvement in virus spread. *Virology* **244**, 79–86.

Bonneville, J.-M., Sanfaçon, H., Fütterer, J. and Hohn, T. (1989). Posttranslational transactivation in cauliflower mosaic virus. *Cell* **59**, 1135–1143.

Boonham, N., Henry, C.R. and Wood, K.R. (1995). The nucleotide sequence and proposed genome organization of oat chlorotic stunt virus, a new soil-borne virus of cereals. *J. Gen. Virol.* **76**, 2025–2034.

Borissensko, S., Schuster, G. and Schmygla, W. (1985). Obtaining a high percentage of explants with negative serological reactions against viruses by combining potato meristem culture with phytoviral chemotherapy. *Phytopathol. Z.* **114**, 185–188.

Borja, M., Rubio, T., Scholthof, H.B. and Jackson, A.O. (1999). Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **12**, 153–162.

Bos, L. (1970). The identification of three new viruses isolated from *Wisteria* and *Pisum* in The Netherlands and the problem of variation within the potato virus Y group. *Neth. J. Plant Pathol.* **76**, 8–46.

Bos, L. (1975). The application of TMV particles as an internal magnification standard for determining virus particle sizes with the electron microscope. *Neth. J. Plant Pathol.* **81**, 168–175.

Bos, L. (1978). *Symptoms of Virus Diseases in Plants*, 3rd edn. Pudoc, Wageningen.

Bos, L.(1982). Crop losses caused by viruses. *Crop Protect.* **1**, 263–282.

Bos, L. (1999a). Beijerinck's work on tobacco mosaic virus: historical context and legacy. *Phil. Trans. R. Soc.Lond. B* **354**, 675–685.

Bos, L. (1999b). The naming of viruses: an urgent call to order. *Arch. Virol.* **144**, 631–636.

Bos, L. (2000a). 100 years of virology: from vitalism via molecular biology to genetic engineering. *Trends Microbiol.* **8**, 82–87.

Bos, L. (2000b). Structure and typography of virus names. *Arch. Virol.* **145**, 429–432.

Botstein, D. (1980). A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **354**, 484–491.

Botstein, D. and Fink, G.R. (1988). Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science* **240**, 1439–1443.

Bottcher, B. and Crowther, R.A. (1996). Difference imaging reveals ordered regions of RNA in turnip yellow mosaic virus. *Structure* **4**, 387–394.

Bottrell, D.G. and Barbosa, P. (1998). Manipulating natural enemies by plant varietal selection and modification: a realistic strategy? *Annu. Rev. Entomol.* **43**, 347–367.

Bouley, J.-P., Briand, J.-P., Genevaux, M., Pinck, M. and Witz, J. (1976). The structure of eggplant mosaic virus: evidence for the presence of low molecular weight RNA in top component. *Virology* **69**, 775–781.

Boulton, M.I. and Markham, P.G. (1986). The use of squash-blotting to detect plant pathogens in insect vectors. In: R.A.C. Jones and L. Torrance (eds) *Developments and Applications in Virus Testing*, Dev. Appl. Biol. I, pp. 55–69. Association of Applied Biologists, Wellesbourne.

Boulton, M.I., Buchholz, W.G., Marks, M.S., Markham, P.G. and Davies, J.W. (1989) Specificity of *Agrobacterium*-mediated delivery of maize streak virus DNA to members of the Graminae. *Plant Mol. Biol.* **12**, 31–40.

Boulton, M.I., King, D.I., Markham, P.G., Pinner, M.S. and Davies, J.W. (1991a). Host range and symptoms are determined by specific domains of the maize streak virus genome. *Virology* **181**, 312–318.

Boulton, M.I., King, D.I., Donson, J. and Davies, J.W. (1991b). Point substitutions in a promoter-like region and the V1 gene affect the host range and symptoms of maize streak virus. *Virology* **183**, 114–121.

Boulton, M.I., Pallaghy, C.K., Chatani, M., MacFarlane, S. and Davies, J.W. (1993). Replication of maize streak virus mutants in maize protoplasts: evidence for a movement protein. *Virology* **192**, 85–93.

Boulton, R.E. (1996). Pea early-browning tobravirus. *Plant Pathol.* **45**, 13–28.

Boulton, R.E., Jellis, G.J., Baulcombe, D.C. and Squire, A.M. (1986). The application of complementary DNA probes to routine virus detection, with particular reference to potato viruses. In: R.A.C. Jones and L. Torrance (eds) *Developments and Applications in Virus Testing*, Dev. Appl. Biol. I, pp. 41–53. Association of Applied Biologists, Wellesbourne.

Bouquet, A. (1981). Resistance to grapevine fanleaf virus in muscadine grape inoculated with *Xiphinema index*. *Plant Dis.* **65**, 791–793.

Bourdin, D. and Lecoq, H. (1991). Evidence that heteroencapsidation between two potyviruses is involved in aphid transmission of a non-aphid-transmissible isolate from mixed infections. *Phytopathology* **81**, 1459–1464.

Bousalem, M., Douzery, E.J.P. and Fargette, D. (2000). High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of yam mosaic virus: a contribution to understanding potyvirus evolution. *J. Gen. Virol.* **81**, 243–255.

Bouzoubaa, S., Guilley, H., Jenard, G., Richards, K. and Putz, C. (1985). Nucleotide sequence analysis of RNA3 and RNA4 of beet necrotic yellow vein virus, isolates F2 and G1. *J. Gen. Virol.* **66**, 1553–1564.

Bouzoubaa, S., Ziegler, V., Beck, D., Guilley, H., Richards, K. and Jenard, G. (1986). Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA2. *J. Gen. Virol.* **67**, 1689–1700.

Bouzoubaa, S., Quillet, L., Guilley, H., Jonard, G. and Richards, K. (1987). Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA1. *J. Gen. Virol.* **68**, 615–626.

Bové, C., Mocquot, B. and Bové, J.M. (1972). Turnip yellow mosaic virus RNA synthesis in the plastids: partial purification of a virus-specific, DNA-independent enzyme–template complex. *Symp. Biol. Hung.* **13**, 43–59.

Bové, J.M. and Bové, C. (1985). Turnip yellow mosaic virus RNA replication on the chloroplast envelope. *Physiol. Vég.* **23**, 741–748.

Bové, J.M., Bové, C., Rondot, M.-J. and Morel, G. (1967). Chloroplasts and virus-RNA synthesis. In: T.W. Goodwin (ed.) *The Biochemistry of Chloroplasts*, Vol. 2, pp. 329–339. Academic Press, New York.

Boxall, M. and MacNeill, B.H. (1974). Local lesions as sources of biologically pure strains of tobacco mosaic virus. *Can. J. Bot.* **52**, 23–25.

Boyko, V., Ferralli, J. and Heinlein, M. (2000a). Cell-to-cell movement of TMV RNA is temperature-dependent and corresponds to the association of movement protein with microtubules. *Plant J.* **22**, 315–325.

Boyko, V., Ferralli, J., Ashby, J., Schellenbaum, P. and Heinlein, M. (2000b). Function of microtubules in intercellular transport of plant virus RNA. *Nature Cell Biol.* **2**, 826–832.

Boyko, V., van der Laak, J., Ferralli, J., Suslova, E., Kwon, M.-O. and Heinlein, M. (2000c). Cellular targets of functional and dysfunctional mutants of tobacco mosaic virus movement protein fused to green fluorescent protein. *J. Virol.* **74**, 11339–11346.

Boyle, J.S. and Bergman, E.L. (1967). Factors affecting incidence and severity of internal browning of tomato induced by tobacco mosaic virus. *Phytopathology* **57**, 354–362.

Bozarth, C.S., Weiland, J.J. and Dreher, T.E. (1992). Expression of ORF-69 of turnip yellow mosaic virus is necessary for viral spread in plants. *Virology* **187**, 124–130.

Brachmann, R.K. and Boeke, J.D. (1997). Tag games in yeast: the two hybrid system and beyond. *Curr. Opin. Biotech.* **8**, 561–568.

Bracho, M.A., Moya, A. and Barrio, E. (1998). Contribution of *Taq* polymerase-induced errors to the estimation of RNA diversity. *J. Gen. Virol.* **79**, 2921–2928.

Bradel, B.G., Preil, W. and Jeske, H. (2000). Sequence analysis and genome organization of Poinsettia mosaic virus (PnMV) reveal closer relationship to marafiviruses than to tymoviruses. *Virology* **271**, 289–297.

Bradley, R.H.E. (1956). Effects of depth of stylet penetration on aphid transmission of potato virus Y. *Can. J. Microbiol.* **2**, 539–547.

Bradley, R.H.E. (1959). Loss of virus from the stylets of aphids. *Virology* **8**, 308–318.

Bradley, R.H.E. (1966). Which of an aphid's stylets carry transmissible virus? *Virology* **29**, 396–401.

Bradley, R.H.E. and Rideout, D.W. (1953). Comparative transmission of potato virus Y by four aphid species that infest potato. *Can. J. Zool.* **31**, 333–341.

Bradley, R.H.E., Wade, C.V. and Wood, F.A. (1962). Aphid transmission of potato virus Y inhibited by oils. *Virology* **18**, 327–328.

Bragg, J.N., Lawrence, D.M. and Jackson, A.O. (2001). Interactions of barley stripe mosaic virus B protein. Abstract W42-3, 20th Annual Meeting of the American Society for Virology.

Brakke, M.K. (1951). Density gradient centrifugation: a new separation technique. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 1847–1848.

Brakke, M.K. (1953). Zonal separations by density gradient centrifugation. *Arch. Biochem. Biophys.* **45**, 275–290.

Brakke, M.K. (1960). Density gradient centrifugation and its application to plant viruses. *Adv. Virus Res.* **7**, 193–224.

Brakke, M.K. (1963). Stabilization of brome grass mosaic virus by magnesium and calcium. *Virology* **19**, 367–374.

Brakke, M.K. (1970). Systemic infections for the assay of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **8**, 61–84.

Brakke, M.K. (1984). Mutations, the aberrant ratio phenomenon, and virus infection of maize. *Annu. Rev. Phytopathol.* **22**, 77–94.

Brakke, M.K. and Daly, J.M. (1965). Density-gradient centrifugation: non-ideal sedimentation and the interaction of major and minor components. *Science* **148**, 387–389.

Brakke, M.K. and Rochow, W.F. (1974). Ribonucleic acid of barley yellow dwarf virus. *Virology* **61**, 240–248.

Brakke, M.K. and van Pelt, N. (1970). Properties of infectious ribonucleic acid from wheat streak mosaic virus. *Virology* **42**, 699–706.

Brakke, M.K., Ball, E.M., Hsu, Y.H. and Langenberg, W.G. (1987a). Wheat streak mosaic virus cylindrical inclusion body protein. *J. Gen. Virol.* **68**, 281–287.

Brakke, M.K., White, J.L., Samson, R.G. and Joshi, J. (1987b). Chlorophyll, chloroplast ribosomal RNA, and DNA are reduced by barley stripe mosaic virus systemic infection. *Phytopathology* **78**, 570–574.

Brakke, M.K., Ball, E.M. and Langenberg, W.G. (1988). A non-capsid protein associated with unencapsidated virus RNA in barley infected with barley stripe mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **69**, 481–491.

Branch, A.D. and Dickson, E. (1980). Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by Southern hybridization. *Virology* **104**, 10–26.

Branch, A.D. and Robertson, H.D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* **223**, 450–455.

Branch, A.D., Robertson, H.D. and Dickson, E. (1981). Longer-than-unit-length viroid minus strands are present in RNA from infected plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **78**, 6381–6385.

Branch, A.D., Robertson, H.D., Greer, C., Gegenheimer, P., Peebles, C. and Abelson, J. (1982). Cell-free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. *Science* **217**, 1147–1149.

Branch, A.D., Benenfeld, B.J. and Robertson, H.D. (1985). Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of local tertiary structure in potato spindle tuber viroid and HeLa 5S RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **82**, 6590–6594.

Branch, A.D., Benenfeld, B.J. and Robertson, H.D. (1988a). Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 9128–9132.

Branch, A.D., Benenfeld, B.J., Franck, E.R. *et al.* (1988b). Interference between coinoculated viroids. *Virology* **163**, 538–546.

Brandes, A., Thompson, H., Dean, C. and Heslop-Harrison, J.S. (1997). Multiple repetitive DNA sequences in the paracentromeric regions of *Arabidopsis thaliana* L. *Chromosome Res.* **5**, 238–246.

Brault, V. and Miller, W.A. (1992). Translational frameshifting mediated by a viral sequence in plant cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 2262–2266.

Brault, V., Mutterer, J., Scheidecker, D. *et al.* (2000). Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *J. Virol.* **74**, 1140–1148.

Brederode, F.T., Koper-Zwarthoff, E.C. and Bol, J.F. (1980). Complete nucleotide sequence of alfalfa mosaic virus RNA4. *Nucl. Acids Res.* **8**, 2213–2223.

Brederode, F.T., Taschner, P.E.M., Posthumus, E. and Bol, J.F. (1995). Replicase-mediated resistance to alfalfa mosaic virus. *Virology* **207**, 467–474.

Breyel, E., Casper, R., Ansa, O.A., Kuhn, C.W., Misari, S.M. and Demski, J.W. (1988). A simple procedure to detect a dsRNA associated with groundnut rosette. *J. Phytopathol.* **121**, 118–124.

Briand, J.-P. (1978). Contribution à l'étude de la structure des tymovirus et à l'organisation de leut génome. Thèse DSc, l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.

Briand, J.-P., Al-Moudallal, Z. and van Regenmortel, M.H.V. (1982). Serological differentiation of tobamoviruses by means of monoclonal antibodies. *J. Virol. Meth.* **5**, 293–300.

Briddon, R.W., Watts, J., Markham, P.G. and Stanley, J. (1989). The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. *Virology* **172**, 628–633.

Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J. and Markham, P.G. (1990). Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* **177**, 85–94.

Briddon, R.W., Bedford, I.D., Tsai, J.H. and Markham, P.G. (1996). Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* **219**, 387–394.

Brierley, I. (1995). Ribosomal frameshifting on viral RNAs. *J. Gen. Virol.* **76**, 1885–1892.

Brierley, K.M., Goodman, B.A. and Mayo, M.A. (1993). A mobile element on a virus particle identified by nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. *Biochem. J.* **293**, 657–659.

Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.-X., Ji, L.-H., Ding, S.-W. and Baulcombe, D.C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17**, 6739–6746.

Brill, L.M., Nunn, R.S., Kahn, T.W., Yeager, M. and Beachy, R.N. (2000). Recombinant tobacco mosaic virus movement protein is an RNA-binding, α-helical membrane protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 7112–7117.

Brisco, M.J., Hull, R. and Wilson, T.M.A. (1985). The effect of extraction protocol on the yield, purity, and translation products of RNA from an isometric plant virus. *J. Virol. Meth.* **10**, 195–202.

Brisco, M.J., Hull, R. and Wilson, T.M.A. (1986a). Swelling of isometric and of bacilliform plant virus nucleocapsids is required for virus-specific protein synthesis *in vitro*. *Virology* **148**, 210–217.

Brisco, M.J., Haniff, C., Hull, R., Wilson, T.M.A. and Sattelle, D.B. (1986b). The kinetics of swelling of Southern bean mosaic virus: a study using photon correlation spectroscopy. *Virology* **148**, 218–220.

Brisson, N., Paszkowski, J., Penswick, J.R., Gronenborn, B., Potrykus, I. and Hohn, T. (1984). Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. *Nature (Lond.)* **310**, 511–514.

Britten, R.J. and Davidson, E.H. (1985). Hybridization strategy. In: B.D. Hames and S.J. Higgins (eds) *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, pp. 3–15. IRL Press, Oxford.

Britten, R.J., Graham, D.E. and Neufeld, B.R.(1974). Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. *Methods Enzymol.* **29**, 363–418.

Brlansky, R.H. (1987). Inclusion bodies produced in *Citrus* spp. by citrus tristeza virus. *Phytophylactica* **19**, 211–213.

Brlansky, R.H., Carroll, T.W. and Zaske, S.K. (1986). Some ultrastructural aspects of the pollen transmission of barley stripe mosaic virus in barley. *Can. J. Bot.* **64**, 853–858.

Broadbent, L. (1957). *Investigation of Virus Diseases of Brassica Crops*, A.R.C. Rep. Ser. No. 14. Cambridge University Press, London.

Broadbent, L. (1976). Epidemiology and control of tomato mosaic virus. *Annu. Rev. Phytopathol.* **14**, 75–96.

Broadbent, L. (1962). The epidemiology of tomato mosaic. II. Smoking tobacco as a source of virus. *Ann. Appl. Biol.* **50**, 461–466.

Broadbent, L. (1963). The epidemiology of tomato mosaic. III. Cleaning virus from hands and tools. *Ann. Appl. Biol.* **52**, 225–232.

Broadbent, L. (1964). The epidemiology of tomato mosaic. VII. The effect of TMV on tomato fruit yield and quality under glass. *Ann. Appl. Biol.* **54**, 209–224.

Broadbent, L. (1965a). The epidemiology of tomato mosaic. IX. Transmission of TMV by birds. *Ann. Appl. Biol.* **55**, 67–69.

Broadbent, L. (1965b). The epidemiology of tomato mosaic. VII. Virus infection through tomato roots. *Ann. Appl. Biol.* **55**, 57–66.

Broadbent, L. (1965c). The epidemiology of tomato mosaic. XI. Seed transmission of TMV. *Ann. Appl. Biol.* **56**, 177–205.

Broadbent, L. and Fletcher, J.T. (1963). The epidemiology of tomato mosaic. IV. Persistence of the virus on clothing and glasshouse structures. *Ann. Appl. Biol.* **52**, 233–241.

Broadbent, L., Gregory, P.H. and Tinsley, T.W. (1952). The influence of planting date and manuring on the incidence of virus diseases in potato crops. *Ann. Appl. Biol.* **39**, 509–524.

Broadbent, L., Heathcote, G.D., McDermott, N. and Taylor, C.E. (1957). The effect of date of planting and of harvesting potatoes on virus infection and on yield. *Ann. Appl. Biol.* **45**, 603–622.

Broadbent, L., Green, D.E. and Walker, P. (1963). Narcissus virus diseases. *Daffodil Tulip Yearbook* **28**, 154–160.

Broadbent, L., Read, W.H. and Last, F.T. (1965). The epidemiology of tomato mosaic X. Persistence of TMV infected debris in soil and the effects of soil partial sterilisation. *Ann. Appl. Biol.* **55**, 471–483.

Broglio, E.P. (1995). Mutational analysis of cauliflower mosaic virus gene VI: changes in host range, symptoms, and discovery of transactivation-positive, non-infectious mutants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**, 755–760.

Brown, C.M., Dinesh-Kumar, S.P. and Miller, W.A. (1996a). Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the barley yellow dwarf PAV coat protein gene stop codon. *J. Virol.* **70**, 5884–5892.

Brown, D.J.F. (1986). The transmission of two strains of arabis mosaic virus from England by populations of *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda: Dorylaimoidea) from ten countries. *Rev. Nematol.* **9**, 83–87.

Brown, D.J.F. and Trudgill, D.L. (1984). The spread of carnation ringspot virus in soil with or without nematodes. *Nematologica* **30**, 102–104.

Brown, D.J.F. and Weischer, B. (1998). Specificity, exclusivity and complementarity in the transmission of plant viruses by plant parasitic nematodes: an annotated terminology. *Fund. Appl. Nematol.* **21**, 1–11.

Brown, D.J.F., Ploeg, A.T. and Robinson, D.J. (1989a). A review of reported association between *Trichodorus* and *Paratrichodorus* species (Nematoda: Trichodoridae) and tobraviruses with a description of laboratory methods for examining virus transmission by trichodorids. *Rev. Nematol.* **12**, 235–241.

Brown, D.J.F., Murant, A.F. and Trudgill, D.L. (1989b). Differences between isolates of the English serotype of tomato black ring virus in their transmissibility by an English population of *Longidorus attennatus* (Nematoda: *Dorylaimoidea*). *Rev. Nematol.* **12**, 51–56.

Brown, D.J.F., Robertson, W.M. and Trudgill, D.L. (1995). Transmission of viruses by plant nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**, 223–249.

Brown, D.J.F., Trudgill, D.L. and Robertson, W.M. (1996b). Nepoviruses: transmission by nematodes. In: B.D. Harrison and A.F. Murant (eds) *The Plant Viruses,* Vol. 5: *Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes,* pp. 187–209. Plenum Press, New York.

Browning, K.S., Fletcher, L. and Ravel, J.M. (1988). Evidence that requirements for ATP and wheat germ initiation factors 4A and 4F are affected by a region of satellite tobacco necrosis virus RNA that is 3′ to the ribosomal binding site. *J. Biol. Chem.* **263**, 8380–8383.

Bruening, G. (2000). Virus-dependent RNA agents. In: O.C. Malloy and T.D. Murray (eds) *The Encyclopedia of Plant Pathology.* John Wiley, New York (in press).

Bruening, G., Beachy, R.N., Scalla, R. and Zaitlin, M. (1976). *In vitro* and *in vivo* translation of the ribonucleic acids of a cowpea strain of tobacco mosaic virus. *Virology* **71**, 498–517.

Bruening, G., Buzayan, J.M., Ferreiro, C. and Lim, W. (2000). Evidence for participation of RNA 1-encoded elicitor in cowpea mosaic virus-mediated concurrent protection. *Virology* **266**, 299–309.

Brunt, A.A. and Kenten, R.H. (1963). The use of protein in the extraction of cocoa swollen-shoot virus from cocoa leaves. *Virology* **19**, 388–392.

Brunt, A.A., Foster, G.D., Martelli, G.P. and Zavriev, S.K. (2000a). Genus Potexvirus. In: M.H.V. van Regenmortel, C.M Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner (eds), *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses,* pp. 975–981. Academic Press, San Diego.

Brunt, A.A., Foster, G.D., Morozov, S. Yu. and Zavriev, S.K. (2000b). Genus Carlavirus. In: M.H.V. van Regenmortel, C.M Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner (eds) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses,* pp. 969–975. Academic Press, San Diego.

Buchter, H., Hartmann, W. and Stoesser, R. (1987). Anatomical–histological changes in sharka-infected shoots and roots. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* **94**, 46–57.

Buck, K.W. (1996). Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Adv. Virus Res.* **47**, 159–251.

Buck, K.W. (1999a). Geminiviruses (*Geminiviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology,* 2nd edn, pp. 597–606. Academic Press, San Diego.

Buck, K.W. (1999b). Replication of tobacco mosaic virus RNA. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **54**, 613–627.

Buddenhagen, I.W. (1981). Conceptual and practical considerations when breeding for tolerance or resistance. In: R.C. Staples and G.H. Toenniessen (eds) *Plant Disease Control: Resistance and Susceptibility,* pp. 221–234. Wiley, New York.

Buddenhagen, I.W. (1983). Crop improvement in relation to virus diseases and their epidemiology. In: R.T. Plumb and J.M. Thresh (eds) *Plant Virus Epidemiology,* pp. 25–37. Blackwell, Oxford.

Bujarski, J.J. (1999). Recombination of viruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology,* pp. 1446–1454. Academic Press, San Diego.

Bujarski, J.J. and Kaesberg, P. (1986). Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. *Nature (London)* **321**, 528–531.

Bujarski, J.J. and Nagy, P.D. (1996). Different mechanisms of homologous and nonhomologous recombination in brome mosaic virus: role of RNA sequences and replicase proteins. *Sem. Virol.* **7**, 363–372.

Bujarski, J.J., Hardy, S.F., Miller, W.A. and Hall, T.C. (1982). Use of dodecyl-β-D-maltoside in the purification and stabilization of RNA polymerase from brome mosaic virus-infected barley. *Virology* **119**, 465–473.

Burden, R.S., Rowell, P.M., Bailey, J.A., Loeffler, R.S.T., Kemp, M.S. and Brown, C.A. (1985). Debneyol, a fungicidal sesquiterpene from TMV-infected *Nicotiana debneyi. Phytochemistry* **24**, 2191–2194.

Burgermeister, W. and Koenig, R. (1984). Electro-blot immunoassay — a means for studying serological relationships among plant viruses? *Phytopathol. Z.* **111**, 15–25.

Burgermeister, W., Koenig, R., Weich, H., Sebald, W. and Lesemann, D.-E. (1986). Diversity of the RNAs in thirteen isolates of beet necrotic yellow vein virus in *Chenopodium quinoa* detected by means of cloned cDNAs. *J. Phytopathol.* **115**, 229–242.

Burgess, A.J., Harrington, R. and Plumb, R.T. (1999). Barley and cereal yellow dwarf virus epidemiology and control strategies. In: H.G Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp. 248–279. CAB International, Wallingford, UK.

Burgess, J., Motoyoshi, F. and Fleming, E.N. (1973). The mechanism of infection of plant protoplasts by viruses. *Planta* **112**, 323–332.

Burgess, J., Motoyoshi, F. and Fleming, E.N. (1974a). Structural changes accompanying infection of tobacco protoplasts with two spherical viruses. *Planta* **117**, 133–144.

Burgess, J., Motoyoshi, F. and Fleming, E.N. (1974b). Structural and autoradiographic observations of the infection of tobacco protoplasts with pea enation mosaic virus. *Planta* **119**, 247–256.

Burgyán, J., Grieco, F. and Russo, M. (1989). A defective interfering RNA molecule in *Cymbidium* ringspot virus infections. *J. Gen. Virol.* **70**, 235–239.

Burgyán, J., Dalmay, T., Rubino, L. and Russo, M. (1992). The replication of cymbidium ringspot tombusvirus defective interfering-satellite RNA hybrid molecules. *Virology* **190**, 579–586.

Burgyán, J., Hornyik, C., Szittya, G., Silhavy, D. and Bisztray, G. (2000). The ORF1 products of tombusviruses play a crucial role in lethal necrosis of virus-infected plants. *J. Virol.* **74**, 10873–10881.

Burns, T.M., Harding, R.M and Dale, J.L. (1995). The genome organization of banana bunchy top virus: analysis of six ssDNA components. *J. Gen. Virol.* **76**, 1471–1482.

Burt, P.E., Heathcote, G.D. and Broadbent, L. (1964). The use of insecticides to find when leaf roll and virus Y spread within potato crops. *Ann. Appl. Biol.* **54**, 13–22.

Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D.A., Skrzeczowski, L.J. and Perreault, J.-P. (1999). Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *J. Virol.* **73**, 6353–6360.

Bussière, F., Ouellet, J., Côté, F., Lévesque, D. and Perreault, J.P. (2000). Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J. Virol.* **74**, 2647–2654.

Butler, P.J.G. (1984). The current picture of the structure and assembly of tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **65**, 253–279.

Butler, P.J.G. (1999). Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **354**, 537–550.

Butler, P.J.G. and Klug, A. (1971). Assembly of the particle of tobacco mosaic virus from RNA and disks of protein. *Nature (London)* **229**, 47–50.

Butler, P.J.G., Durham, A.C.H. and Klug, A. (1972). Structures and roles of the polymorphic forms of tobacco mosaic virus protein: IV. Control of mode of aggregation of tobacco mosaic virus protein by proton binding. *J. Mol. Biol.* **72**, 1–18.

Butler, P.J.G., Finch, J.T. and Zimmern, D. (1977). Configuration of tobacco mosaic virus RNA during virus assembly. *Nature (London)* **265**, 217–219.

Büttner, C. and Nienhaus, F. (1989). Virus contamination of soils in forest ecosystems of the Federal Republic of Germany. *Eur. J. For. Pathol.* **19**, 47–53.

Büttner, C., Jacobi, V. and Koenig, R. (1987). Isolation of carnation Italian ringspot virus from a creek in a forested area southwest of Bonn. *J. Phytopathol.* **118**, 131–134.

Buzayan, J.M., Gerlach, W.L. and Bruening, G. (1986a). Satellite tobacco ringspot virus RNA: a subset of the RNA sequence is sufficient for autolytic processing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 8859–8862.

Buzayan, J.M., Gerlach, W.L. and Bruening, G. (1986b). Non-enzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA. *Nature (Lond.)* **323**, 349–353.

Buzayan, J.M., Hampel, A. and Bruening, G. (1986c). Nucleotide sequence and newly formed phosphodiester bond of spontaneously ligated satellite tobacco ringspot virus RNA. *Nucleic Acids Res.* **14**, 9729–9743.

Buzayan, J.M., Gerlach, W.L., Bruening, G., Keese, P. and Gould, A.R. (1986d). Nucleotide sequence of satellite tobacco ringspot RNA and its relationship to multimeric forms. *Virology* **151**, 186–199.

Buzayan, J.M., McNinch, J.S., Schneider, I.R. and Bruening, G. (1987). A nucleotide sequence rearrangement distinguishes two isolates of satellite tobacco ringspot virus RNA. *Virology* **160**, 95–99.

Buzen, F.G., Jr., Niblett, C.L., Hooper, G.R., Hubbard, J. and Newman, M.A. (1984). Further characterisation of panicum mosaic virus and its associated satellite virus. *Phytopathology* **74**, 313–318.

Buzzell, R.I. and Tu, J.C. (1984). Inheritance of soybean resistance to soybean mosaic virus. *J. Hered.* **75**, 82.

Cabaleiro, C. and Segura, A. (1997). Field transmission of grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. *Plant Dis.* **81**, 283–287.

Cabauatan, P.Q., Cabunagan, R.C and Koganezawa, H. (1995). Biological variants of rice tungro viruses in the Philippines. *Phytopathology* **85**, 77–81.

Cabauatan, P.Q., Melcher, U., Ishikawa, K. *et al.* (1999). Sequence changes in six variants of rice tungro bacilliform virus and their phylogenetic relationships. *J. Gen. Virol.* **80**, 2229–2237.

Cadman, C.H. and Harrison, B.D. (1959). Studies on the properties of soil-borne viruses of the tobacco-rattle type occurring in Scotland. *Ann. Appl. Biol.* **47**, 542–556.

Calder, V.L and Palukaitis, P. (1992). Nucleotide sequence analysis of the movement genes of resistance breaking strains of tomato mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **73**, 165–168.

Callaway, A.S., Huang, Z. and Howell, S.H. (2000). Host suppressors in *Arabidopsis thaliana* of mutations in the movement protein gene of cauliflower mosaic virus. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **13**, 512–519.

Calvert, L.A., Ospina, M.D. and Shepherd, R.J. (1995). Characterization of cassava vein mosaic virus: a distinct plant pararetrovirus. *J. Gen. Virol.* **76**, 1271–1278.

Calvert, L.A., Cuervo, M.I., Ospina, M.D., Fauquet, C.M. and Ramirez, B.C. (1996). Characterization of cassava common mosaic virus and a defectiveRNA species. *J. Gen. Virol.* **77**, 525–530.

Camacho-Henriquez, A. and Sänger, H.L. (1984). Purification and partial characterisation of the major pathogenesis-related tomato leaf protein P14 from potato spindle tuber viroid (PSTV)-infected tomato leaves. *Arch. Virol.* **81**, 263–284.

Camerini-Otero, R.D., Posey, P.N., Koppel, D.E., Schaefer, D.W. and Franklin, R.M. (1974). Intensity fluctuation spectroscopy of laser light scattered by solutions of spherical viruses: R17, Q, BSV, PM2 and T7: II. Diffusion coefficients, molecular weights, salvation, and particle dimensions. *Biochemistry* **13**, 960–970.

Campbell, B.C., Steffen-Campbell, J.D., Sorensen, J.T. and Gill, R.J. (1995). Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from 18S nucleotide sequences. *Syst. Entomol.* **20**, 175–194.

Campbell, R.N. (1996). Fungal transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**, 87–108.

Campbell, R.N., Wipf-Scheibel, C. and Lecoq, H. (1996). Vector-assisted seed transmission of melon necrotic spot virus in melon. *Phytopathology* **86**, 1294–1298.

Canady, M.A., Day, J. and McPherson, A. (1995). Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of turnip yellow mosaic virus (TYMV). *Proteins* **21**, 78–81.

Canady, M.A., Larson, S.B., Day, J. and McPherson, A. (1996). Crystal structure of turnip yellow mosaic virus. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 771–781.

Candelier-Harvey, P. and Hull, R. (1993). Cucumber mosaic virus genome is encapsidated in alfalfa mosaic virus coat protein expressed in transgenic plants. *Transgenic Res.* **2**, 277–285.

Candresse, T, Mouches, C. and Bové, J.M. (1986). Characterisation of the virus encoded subunit of turnip yellow mosaic virus RNA replicase. *Virology* **152**, 322–330.

Candresse, T., Batisti, M., Renaudin, J., Mouches, C. and Bové, J.M. (1987). Immunodetection of turnip yellow mosaic virus non-structural proteins in infected chinese cabbage leaves and protoplasts. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.* **138**, 217–227.

Candresse, T., Macquaire, G., Monsion, M. and Dunez, J. (1988). Detection of chrysanthemum stunt viroid (CSVd) using nick translated probes in a dot blot hybridization assay. *J. Virol. Methods* **20**, 185–193.

Canto, T. and Palukaitis, P. (1999a). Are tubules generated by the 3a protein necessary for cucumber mosaic virus movement? *Mol. Plant–Microb. Interact.* **11**, 985–993.

Canto, T. and Palukaitis, P. (1999b). The hypersensitive response to cucumber mosaic virus in *Chenopodium amaranticolor* requires virus movement outside the initially infected cell. *Virology* **265**, 74–82.

Capoor, S.P. (1949). The movement of tobacco mosaic viruses and potato virus X through tomato plants. *Ann. Appl. Biol.* **36**, 307–319.

Carette, J.E., Stuiver, M., van Lent, J., Wellink, J. and van Kammen, A. (2000). Cowpea mosaic virus infection induces a massive proliferation of endoplasmic reticulum but not golgi membranes and is dependent on de novo membrane synthesis. *J. Virol.* **74**, 6556–6563.

Carlton, W.M., Braun, E.J. and Gleason, M.L. (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michigensis* into tomato leaves through hydothodes. *Phytopathology* **99**, 525–529.

Carpenter, C.D. and Simon, A.E. (1996a). *In vivo* repair of 3′ end deletions in a TCV satellite RNA may involve two abortive synthesis and priming events. *Virology* **226**, 153–160.

Carpenter, C.D. and Simon, A.E. (1996b). *In vivo* restoration of biologically active 3′ ends of virus-associated RNAs by non-homologous RNA recombination and replacement of a terminal motif. *J. Virol.* **70**, 478–486.

Carpenter, C.D., Oh, J.-W., Zhang, C. and Simon, A.E. (1995). Involvement of a stem-loop structure in the location of junction sites in viral RNA recombination. *J. Mol. Biol.* **245**, 608–622.

Carr, J.P. and Zaitlin, M. (1993). Replicase-mediated resistance. *Semin. Virol.* **4**, 339–347.

Carr, J.P., Beachy, R.N. and Klessig, D.F. (1989). Are the PR1 proteins involved in genetically engineered resistance to TMV? *Virology* **169**, 470–473.

Carr, J.P., Marsh, L.E., Lomonossoff, G.P., Sekiya, M.E. and Zaitlin, M. (1992). Resistance to tobacco mosaic virus induced by the 54-kDa gene sequence requires expression of the 54-kDa protein. *Mol. Plant Microb Interact.* **5**, 397–404.

Carr, J.P., Gal-On, A., Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1994). Replicase-mediated resistance to cucumber mosaic virus in transgenic plants involves suppression of both virus replication in inoculated leaves and long-distance movement. *Virology* **199**, 439–447.

Carr, R.J. and Kim, K.S. (1983). Evidence that bean golden mosaic virus invades non-phloem tissue in double infections with tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **64**, 2489–2492.

Carrier, K., Hans, F. and Sanfaçon, H. (1999). Mutagenesis of amino acids at two tomato ringspot nepovirus cleavage sites: effect on proteolytic processing in *cis* and in *trans* by the 3C-like protease. *Virology* **256**, 161–175.

Carrington, J.A. and Freed, D.D. (1990). Cap-dependent enhancement of translation by a plant potyvirus 5′ nontranslated region. *J. Virol.* **64**, 1590–1597.

Carrington, J.C. and Dougherty, W.G. (1987a). Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *J. Virol.* **61**, 2540–2548.

Carrington, J.C. and Dougherty, W.G. (1987b). Processing of the tobacco etch virus 49K protease requires autoproteolysis. *Virology* **160**, 355–362.

Carrington, J.C. and Dougherty, W.G. (1988). A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 3391–3395.

Carrington, J.C. and Herndon, K.L. (1992). Characterization of the potyviral HC-Pro autoproteolytic cleavage site. *Virology* **187**, 308–315.

Carrington, J.C. and Morris, T.J. (1984). Complementary DNA cloning and analysis of carnation mottle virus RNA. *Virology* **139**, 22–31.

Carrington, J.C. and Morris, T.J. (1986). High resolution mapping of carnation mottle virus-associated RNAs. *Virology* **150**, 196–206.

Carrington, J.C. and Whitham, S.A. (1998). Viral invasion and host defense: strategies and counter-strategies. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 336–341.

Carrington, J.C., Morris, T.J., Stockley, P.G. and Harrison, S.C. (1987). Structure and assembly of turnip crinkle virus: IV. Analysis of the coat protein gene and implications of the subunit primary structure. *J. Mol. Biol.* **194**, 265–276.

Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D. and Dougherty, W.G. (1989). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J.* **8**, 365–370.

Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. and Schaad, M.C. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* **8**, 1669–1681.

Carrington, J.C., Jensen, P.E. and Schaad, M.C. (1998). Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J.* **14**, 393–400.

Carrington, J.C., Kasschau, K.D. and Johansen, L.K. (2001). Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology* **281**, 1–5.

Carroll, T.W. (1974). Barley stripe mosaic virus in sperm and vegetative cells of barley pollen. *Virology* **60**, 21–28.

Carroll, T.W. (1983). Certification schemes against barley stripe mosaic. *Seed Sci. Technol.* **11**, 1033–1042.

Carroll, T.W. and Chapman, S.R. (1970). Variation in embryo infection and seed transmission of barley ctripe mosaic virus within and between two cultivars of barley. *Phytopathology* **60**, 1079–1081.

Carroll, T.W., Gossel, P.L. and Hockett, E.A. (1979). Inheritance of resistance to seed transmission of barley stripe mosaic virus in barley. *Phytopathology* **69**, 431–433.

Carroll, T.W., Hockett, E.A. and Zaske, S.K. (1983). Registration of mobet barley germplasm. *Crop Sci.* **23**, 599–600.

Carsner, E. (1925). Attenuation of the virus of sugar beet curly-top. *Phytopathology* **15**, 745–757.

Cartea, M.E., Migdal, M., Galle, A.M., Pelletier, G. and Guerche, P. (1998). Comparison of sense and antisense methodologies for modifying the fatty acid composition of *Arabidopsis thaliana* oilseed. *Plant Sci.* **136**, 181–194.

Carter, M.J. and ter Meulen, V. (1984). The application of monoclonal antibodies in the study of viruses. *Adv. Virus Res.* **29**, 95–130.

Cartwright, B., Smale, C.J., Brown, F. and Hull, R. (1972) Model for vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **10**, 256–260.

Cascone, P.J., Carpenter, C.D., Li, X.H. and Simon, A.E. (1990). Recombination between satellite RNAs of turnip crinkle virus. *EMBO J.* **9**, 1709–1715.

Caspar, D.L.D. (1963). Assembly and stability of the tobacco mosaic virus particle. *Adv. Protein Chem.* **18**, 37–121.

Caspar, D.L.D. and Holmes, K.C. (1969). Structure of dahlemense strain of tobacco mosaic virus: a periodically derformed helix. *J. Mol. Biol.* **46**, 99–133.

Caspar, D.L.D. and Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **27**, 1–24.

Caspar, D.L.D., Dulbecco, R., Klug, A., Lwoff, A., Stoker, M.G.P., Tournier, P. and Wildy, P. (1962). Proposals. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **27**, 49.

Cassells, A.C. and Herrick, C.C. (1977). The identification of mild and severe strains of tobacco mosaic virus in double inoculated tomato plants. *Ann. Appl. Biol.* **86**, 37–46.

Castel, A., Kraal, B., De Graaf, J.M. and Bosch, L. (1979). The primary structure of the coat protein of alfalfa mosaic virus strain VRU. A hypothesis on the occurrence of two conformations in the assembly of the protein shell. *Eur. J. Biochem.* **102**, 125–138.

Castellano, M.M., Sanz-Burgos, A.P. and Gutierrez, C. (1999). Initiation of DNA replication in an eukaryotic rolling-circle replicon: identification of multiple DNA-protein complexes at the geminivirus origin. *J. Mol. Biol.* **290**, 639–652.

Castello, J.D., Rogers, S.O., Starmer, W.T. *et al.* (1999). Detection of tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient glacial ice. *Polar Biol.* **22**, 207–212.

Castillo, M.B. and Orlob, G.B. (1966). Transmission of two strains of cucumber mosaic and alfalfa mosaic viruses by single aphids of *Myzus persicae*. *Phytopathology* **56**, 1028–1030.

Catherall, P.L., Jones, A.T. and Hayes, J.D. (1970). Inheritance and effectiveness of genes in barley that condition tolerance to barley yellow dwarf virus. *Ann. Appl. Biol.* **65**, 153–161.

Cattaneo (1991). Different types of messenger RNA editing. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 71–88.

Cecchini, E., Gong, Z., Geri, C., Covey, S.N. and Milner, J.J. (1997a). Transgenic *Arabidopsis* lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom-like phenotypes and accumulate inclusion bodies. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 1094–1101.

Cecchini, E., Al-Kaff, N., Covey, S.N. and Milner, J.J. (1997b). Variation in symptom expression in *Arabidopsis* ecotypes and mutants infected with cauliflower mosaic virus. *J. Exp. Bot.* **48**, S18.

Cecchini, E., Al-Kaff, N.S., Bannister, A. *et al.* (1998). Pathogenic interactions between variants of cauliflower mosaic virus and *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **49**, 731–737.

Cech, T.R. (1986). A model for the RNA-catalysed replication of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4360–4363.

Cech, T.R. and Bass, B.L. (1986). Biological catalysis by RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 599–629.

Cerutti, L., Mian, N. and Bateman, A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentuiation proteins: novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 481–482.

Chaerle, L., van Caeneghem, W., Messens, E., Lambers, H., van Montagu, M. and van der Straeten, D. (1999). Presymptomatic visualization of plant–virus interactions by thermography. *Nature Biotechnol.* **17**, 813–816.

Chalcroft, J.P. and Matthews, R.E.F. (1966). Cytological changes induced by turnip yellow mosaic virus infections. *Virology* **28**, 555–562.

Chalcroft, J.P. and Matthews, R.E.F. (1967a). Virus strains and leaf ontogeny as factors in the production of leaf mosaic patterns by turnip yellow mosaic virus. *Virology* **33**, 167–171.

Chalcroft, J.P. and Matthews, R.E.F. (1967b). Role of virus strains and leaf ontogeny in the production of mosaic patterns by turnip yellow mosaic virus. *Virology* **33**, 659–673.

Chalfant, R.B. and Chapman, R.K. (1962). Transmission of cabbage viruses A and B by the cabbage aphid and the green peach aphid. *J. Econ. Entomol.* **55**, 584–590.

Chamberlain, E.E., Atkinson, J.D. and Hunter, J.A. (1951). Plum mosaic, a virus disease of plums, peaches and apricots in New Zealand. *N. Z. J. Sci. Technol.* **33**, 1–16.

Chambers, T.C. and Francki, R.I.B. (1966). Localization and recovery of lettuce necrotic yellows virus from xylem tissues of *Nicotiana glutinosa*. *Virology* **29**, 673–676.

Champness, J.N., Bloomer, A.C., Bricogne, G., Butler, P.J.G. and Klug, A. (1976). The structure of the protein disk of tobacco mosaic virus to 5 Å resolution. *Nature (London)* **259**, 20–24.

Chan, M.S. and Jeger, M.J. (1994). An analytical model of plant virus disease dynamics with roguing and replanting. *J. Appl. Ecol.* **31**, 413–427.

Chandrika, R., Rabindran, S., Lewandowski, D.J., Manjunath, K.L. and Dawson, W.O. (2000). Full-length tobacco mosaic virus RNAs and defective RNAs have different 3′ replication signals. *Virology* **273**, 198–209.

Chang, C.-A., Hiebert, E. and Purcifull, D.E. (1988). Purification, characterisation and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic virus and clover yellow vein, potyviruses. *Phytopathology* **78**, 1266–1275.

Chang, Y.C., Borja, M., Scholthof, H.B., Jackson, A.O. and Morris, T.J. (1995). Host effects and sequences essential for accumulation of defective interfering RNAs of cucumber necrosis and tomato bushy stunt tombusviruses. *Virology* **210**, 41–53.

Chao, L. (1997). Evolution of sex and the molecular clock in RNA viruses. *Gene* **205**, 301–308.

Chapman, M. and Kao, C. (1999). A minimal RNA promoter for minus-strand RNA synthesis by brome mosaic virus polymerase complex. *J. Mol. Biol.* **286**, 709–720.

Chapman, M.S. (1998). Watching ones P's and Q's: promiscuity, plasticity and quasiequivalence in a T = 1 virus. *Biophys. J.* **74**, 639–644.

Chapman, S., Kavanagh, T. and Baulcombe, D. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.* **2**, 549–557.

Chaumpluk, P., Sasaki, Y., Nakajima, N. *et al.* (1996). Six new subgroup I members of Japanese cucumber mosaic virus as determined by nucleotide sequence analysis of RNA3's cDNAs. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **62**, 40–44.

Chauvin, C., Pfeiffer, P., Witz, J. and Jacrot, B. (1978). Structural polymorphism of bromegrass mosaic virus: a neutron small angle scattering investigation. *Virology* **88**, 138–148.

Chauvin, C., Jacrot, B., Lebeurier, G. and Hirth, L. (1979). The structure of cauliflower mosaic virus: a neutron diffraction study. *Virology* **96**, 640–641.

Chelvanayagam, G., Heringa, J. and Argos, P. (1992). Anatomy and evolution of proteins displaying the viral capsid jellyroll topology. *J. Mol. Biol.* **228**, 220–242.

Chen, B. and Francki, R.B. (1990). Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *J. Gen. Virol.* **71**, 939–944.

Chen, G., Müller, M., Potrykus, I., Hohn, T. and Fütterer, J. (1994). Rice tungro bacilliform virus: transcription and translation in protoplasts. *Virology* **204**, 91–100.

Chen, G., Rothnie, H.M., He, X., Hohn, T. and Fütterer, J. (1996). Efficient transcription from the rice tungro bacilliform virus promoter requires elements downstream of the transcription start site. *J. Virol.* **70**, 8411–8421.

Chen, H. and Ahlquist, P. (2000). Brome mosaic virus polymerase-like protein 2a is directed to the endoplasmic reticulum by helicase-like viral protein 1a. *J. Virol.* **74**, 4310–4318.

Chen, J., Torrance, L., Cowan, G.H., MacFarlane, S.A., Stubbs, G. and Wilson, T.M.A. (1997). Monoclonal antibodies detect a single amino acid difference between the coat proteins of soilborne wheat mosaic virus isolates: implications for virus structure. *Phytopathology* **87**, 295–301.

Chen, J., Noueiry, A. and Ahlquist, P. (2001). Brome mosaic virus protein 1a recruits viral RNA2 to RNA replication through a 5′ proximal RNA2 signal. *J. Virol.* **75**, 3207–3219.

Chen, L.-C., Durand, D.P. and Hill, J.H. (1982). Detection of pathogenic strains of soybean mosaic virus by enzyme-linked immunosorbent assay with polystyrene plates and beads as the solid phase. *Phytopathology* **72**, 1177–1181.

Chen, M.-H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A.K. and Citovsky, V. (2000). Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J.* **19**, 913–920.

Chen, Z., Stauffacher, C., Li, Y. *et al.* (1989). Protein-RNA interactions in an icosahedral virus at 3.0 Å resolution. *Science* **245**, 154–159.

Cheng, C.-P., Tzafrir, I., Lockhart, B.E.L. and Olszewski, N.E. (1998). Tubules containing virions are present in plant tissues infected with *Commelina* yellow mottle badnavirus. *J. Gen. Virol.* **79**, 925–929.

Cheng, N.-H., Su, C.-L., Carter, S.A. and Nelson, R.S. (2000). Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* **23**, 349–362.

Cheng, R.H., Olson, N.H. and Baker, T.S. (1992). Cauliflower mosaic virus: a 420 subunit (T = 7), multiplayer structure. *Virology* **186**, 655–668.

Chester, K.S. (1935). A serological estimate of the absolute concentration of tobacco mosaic virus. *Science* **82**, 17.

Chester, K.S. (1936). Separation and analysis of virus strains by means of precipitin tests. *Phytopathology* **26**, 778–785.

Chetverin, A.B. (1999). The puzzle of RNA recombination. *FEBS Lett.* **460**, 1–5.

Chiarappa, L. (ed.) (1971). Crop loss assessment methods. In: *Manual on the Evaluation and Prevention of Pests, Disease and Weeds*. Alden Press, Oxford.

Chiko, A.W. (1975). Evidence of multiple virion components in leaf-dip preparations of barley stripe mosaic virus. *Virology* **63**, 115–122.

Childress, A.M. and Ramsdell, D.C. (1987). Bee mediated transmission of blueberry leaf mottle virus via infected pollen in high-bush blueberry. *Phytopathology* **77**, 167–172.

Childress, S.A. and Harris, K.F. (1989). Localization of virus-like particles in the foreguts of viruliferous *Graminella nigrifrons* leafhoppers carrying the semi-persistent maize chlorotic dwarf virus. *J. Gen. Virol.* **70**, 247–251.

Chisholm, S.T., Mahajan, S., Whitham, S.A., Yamamoto, M.L and Carrington, J.C. (2000). Cloning of the *Arabidopsis RTM1* gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 489–494.

Chiu, R.-J. and Black, L.M. (1969). Assay of wound tumor virus by the fluorescent cell counting technique. *Virology* **37**, 667–677.

Chiu, R.-J., Liu, H.-Y., MacLeod, R. and Black, L.M. (1970). Potato yellow dwarf virus in leafhopper cell culture. *Virology* **40**, 387–396.

Chivasa, S. and Carr, J.P. (1998). Cyanide restores *N* gene-mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic plants expressing salicylic acid hydrolase. *Plant Cell* **10**, 1489–1498.

Chivasa, S., Murphy, A.M., Naylor, M. and Carr, J.P. (1997). Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism. *Plant Cell* **9**, 547–557.

Chiykowski, L.N. and Chapman, R.K. (1965). Migration of the six-spotted leaf hopper in central North America. *Res. Bull. Wis. Agric. Exp. Stn.* **261**, 21–45.

Cho, H.-S., Ha, N.-C., Kang, L.-W. *et al.* (1998). Crystal structure of RNA helicase from genotype 1b hepatitis C virus. *J. Biol. Chem.* **273**, 15045–15052.

Cho, J.J., Mau, R.F.L., German, T.L. *et al.* (1989). A multidisciplinary approach to management of tomato spotted wilt virus in Hawaii. *Plant Dis.* **73**, 375–383.

Choi, H.-K., Tong, L., Minor, W. *et al.* (1991). Structure of *Sindbis virus* core protein reveals a chymotrypsin-like serine proteinase and the organization of the virion. *Nature* **354**, 37–43.

Choi, J. and Loesch-Fries, S. (1999). Effect of C-terminal mutations of alfalfa mosaic virus coat protein on dimer formation and assembly *in vitro*. *Virology* **260**, 182–189.

Choi, Y.G., Grantham, G.L. and Rao, A.L.N. (2000). Molecular studies on bromovirus capsid protein: VI. Contributions of the N-terminal arginine-rich motif of BMV capsid protein in virion stability and RNA packaging. *Virology* **270**, 377–385.

Choudhury, M.M. and Rosenkranz, E. (1983). Vector relationship of *Graminella nigrifrons* to maize chlorotic dwarf virus. *Phytopathology* **73**, 685–690.

Christie, R.G. and Edwardson, J.R. (1977). Light and electron microscopy of plant virus inclusions. *Fla. Agric. Exp. Sta. Monogr. Ser. 9*. 150 pp.

Christie, R.G. and Edwardson, J.R. (1986). Light microscopic techniques for detection of plant virus inclusions. *Plant Dis.* **70**, 273–279.

Christie, S.R., Purcifull, D.E., Crawford, W.E. and Ahmed, N.A. (1987). Electron microscopy of negatively stained clarified viral concentrates obtained from small tissue samples with appendices on negative staining techniques. *Bull. Fla. Agric. Exp. Stn.* **872**, 1–45.

Chu, M., Park, J.-W. and Scholthof, H.B. (1999). Separate regions on the tomato bushy stunt virus p22 protein mediate cell-to-cell movement versus elicitation of effective resistance responses. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **12**, 285–292.

Chu, M., Desvoyes, B., Turina, M., Noad, R. and Scholthof, K.B.G. (2000). Genetic dissection of tomato bushy stunt virus p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. *Virology* **266**, 79–87.

Chu, P.W.G. and Francki, R.I.B. (1982). Detection of lettuce necrotic yellows virus by an enzyme-linked immunosorbent assay in plant hosts and the insect vector. *Ann. Appl. Biol.* **100**, 149–156.

Chu, P.W.G. and Francki, R.I.B. (1983). Chemical and serological comparison of the coat proteins of velvet tobacco mottle and *Solanum nodiflorum* mottle viruses. *Virology* **129**, 350–356.

Chu, P.W.G. and Helms, K. (1988). Novel virus-like particles containing single-stranded DNAs associated with subterranean clover stunt disease. *Virology* **167**, 38–49.

Chu, P.W.G., Boccardo, G. and Francki, R.I.B. (1981). Requirement of a genome associated protein of tobacco ringspot virus for infectivity but not for *in vitro* translation. *Virology* **109**, 428–430.

Cireli, B. (1976). Observations on the effects of some air pollutants on *Zea mays* leaf tissue. *Phytopathol. Z.* **86**, 233–239.

Cirulli, M. and Alexander, L. (1969). Influence of temperature and strain of tobacco mosaic virus on resistance of a tomato breeding line derived from *Lycopersicon peruvianum*. *Phytopathology* **59**, 1287–1297.

Citovsky, V. (1999). Tobacco mosaic virus: a pioneer of cell-to-cell movement. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **354**, 637–643.

Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G. and Zambryski, P. (1990). The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* **60**, 637–647.

Citovsky, V., Knorr, D. and Zambryski, P. (1991). Gene 1: a potential cell-to-cell movement locus of cauliflower mosaic virus, encodes an RNA-binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2476–2480.

Citovsky, V., Wong, M.L., Shaw, A.L., Prasad, B.V.V. and Zambryski, P. (1992). Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* **4**, 397–411.

Citovsky, V., McLean, B.G., Zupan, J.R. and Zambryski, P. (1993). Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated cell wall-associated protein kinase. *Genes Dev.* **7**, 904–910.

Clark, A.J., Bertens, P., Wellink, J., Shanks, M. and Lomonossoff, G.P. (1999). Studies on hybrid comoviruses reveal the importance of three-dimensional structure for processing of the viral coat proteins and show that the specificity of cleavage is greater in *trans* than in *cis*. *Virology* **263**, 184–194.

Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**, 475–483.

Clark, M.F. and Barbara, D.J. (1987). A method for the quantitative analysis of ELISA data. *J. Virol. Methods* **15**, 213–222.

Clark, M.F. and Bar-Joseph, M. (1984). Enzyme immunosorbent assays in plant virology. *Methods Virol.* **7**, 51–85.

Clark, M.F., Matthews, R.E.F. and Ralph, R.K. (1964). Ribosomes and polyribosomes in Brassica pekinensis. *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 289–304.

Clark, R.W. (1976). Calculation of S_{20w} values using ultracentrifuge sedimentation data from linear sucrose gradients: an improved, simplified method. *Biochim. Biophys. Acta* **428**, 269–274.

Clark, W.G., Fitchen, J.H., Nejidat, A., Deom, C.M. and Beachy, R.N. (1995). Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus (TMV). 2. Challenge by a mutant with altered virion surface does not overcome resistance conferred by TMV coat protein. *J. Gen. Virol.* **76**, 2613–2617.

Clement, D.L., Lister, R.M. and Foster, J.E. (1986). ELISA-based studies on the ecology and epidemiology of barley yellow dwarf virus in Indiana. *Phytopathology* **76**, 86–92.

Clinch, P., Loughnane, J.B. and Murphy, P.A. (1938). A study of the infiltration of viruses into seed potato stocks in the field. *Sci. Proc. R. Dublin Soc.* **22**, 18–31.

Close, R.C. (1962) Some interactions between viruses when multiplying together in plants. PhD thesis, University of London.

Close, R.C. and Tomlinson, A.I. (1975). Dispersal of the grain aphid *Macrosiphum miscanthi* from Australia to New Zealand. *N. Z. Entomol.* **6**, 62–65.

Clover, G. and Henry, C. (1999). Detection and discrimination of wheat spindle streak mosaic virus and wheat yellow mosaic virus using multiplex RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**, 891–896.

Coakley, S.M., Campbell, R.N. and Kimble, K.A. (1973). Internal rib necrosis and rusty brown discoloration of climax lettuce induced by lettuce mosaic virus. *Phytopathology* **63**, 1191–1197.

Cochran, G.W. (1946). Effect of shading techniques on transmission of tobacco mosaic virus through dodder. *Phytopathology* **36**, 396.

Cock, L.J. (1968). Virus diseases of lettuce. *NAAS Q. Rev.* **79**, 126–138.

Cockbain, A.J., Gibbs, A.J. and Heathcoate, G.D. (1963). Some factors affecting the transmission of sugar-beet mosaic and pea mosaic viruses by *Aphis fabae* and *Myzus persicae*. *Ann. Appl. Biol.* **52**, 133–143.

Cockerham, G. (1970). Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity* **25**, 309–348.

Cocking, C. (1966). An electron microscope study of the initial stages of infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. *Planta* **68**, 206–214.

Cogoni, C. and Macino, G. (1999a). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* **399**, 166–169.

Cogoni, C. and Macino, G. (1999b). Posttrancriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* **286**, 2342–2344.

Cogoni, C. and Macino, G. (1999c). Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 657–662.

Cohen, J. and Loebenstein, G. (1975). An electron microscope study of starch lesions in cucumber cotyledons infected with tobacco mosaic virus. *Phytopathology* **65**, 32–39.

Cohen, J., Loebenstein, G. and Spiegel, S. (1988). Infection of sweet potato by cucumber mosaic virus depends on the presence of sweet potato feathery mottle virus. *Plant Dis.* **72**, 583–585.

Cohen, S. and Antignus, Y. (1994). Tomato yellow leafcurl virus, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Adv. Dis. Vector Res.* **10**, 259–288.

Cohen, S.S. (1981). Reducing the spread of aphid-transmitted viruses in peppers by coarse-net cover. *Phytoparasitica* **9**, 69–76.

Cohen, S.S. and Greenberg, M.L. (1981). Spermidine, an intrinsic component of turnip yellow mosaic virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **78**, 5470–5474.

Cohen, S.S. and Marco, S. (1973). Reducing the spread of aphid-transmitted viruses in peppers by trapping the aphids on sticky yellow polyethylene sheets. *Phytopathology* **63**, 1207–1209.

Cohen, Y., Qu, F., Gisel, A., Morris, T.J. and Zambryski, P.C. (2000). Nuclear localization of turnip crinkle virus movement protein p8. *Virology* **273**, 276–285.

Colinet, D., Kummert, J., Lepoivre, P. and Semal, J. (1994). Identification of distinct potyviruses in mixedly-infected sweet-potato by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Phytopathology* **84**, 65–69.

Colinet, D., Nguyen, M., Kummert, J. and Lepoivre, P. (1998). Differentiation among potyviruses infecting sweet potato based on genus-specific and virus-specific reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Dis.* **82**, 223–229.

Collendavelloo, J., Legrand, M. and Fritig, B. (1982). Plant disease and regulation of enzyriies involved in lignification. *De novo* synthesis controls o-methyltransferase activity in hypersensitive tobacco leaves infected by tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* **21**, 271–281.

Collins, R.F., Gellatly, D.L., Sehgal, O.P. and Abouhaidar, M.G. (1998). Self-cleaving circular RNA associated with rice yellow mottle virus is the smallest viroid-like RNA. *Virology* **241**, 269–275.

Collmer, C.W. and Howell, S.H. (1992). Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**, 419–442.

Collmer, C.W. and Kaper, J.M. (1985). Double-stranded RNAs of cucumber mosaic virus and its satellite contain an unpaired terminal guanosine: implications for replication. *Virology* **145**, 249–259.

Collmer, C.W. and Kaper, J.M. (1988). Site-directed mutagenesis of potential protein-coding regions in expressible cloned cDNAs of cucumber mosaic viral satellites. *Virology* **163**, 293–298.

Collmer, C.W. and Zaitlin, M. (1983). The H protein isolated from tobacco mosaic virus reassociates with virions reconstituted *in vitro*. *Virology* **126**, 449–458.

Collmer, C.W., Vogt, V.M. and Zaitlin, M. (1983). H protein, a minor protein of TMV virions, contains sequences of the viral coat protein. *Virology* **126**, 429–448.

Collmer, C.W., Hadidi, A. and Kaper, J.M. (1985). Nucleotide sequence of the satellite of peanut stunt virus reveals structural homologies with viroids and certain nuclear and mitochondrial introns. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **82**, 3110–3114.

Collmer, C.W., Marston, M.F., Taylor, J.C. and Jahn, M. (2000). The *I* gene of bean: a dosage-dependent allele conferring extreme resistance, hypersensitive resistance, or spreading vascular necrosis in response to the potyvirus bean common mosaic virus. *Mol. Plant Microb. Interact.* **13**, 1266–1270.

Comeau, A. and Plourde, A. (1987). Cell, tissue culture and intergeneric hybridization for barley yellow dwarf virus resistance in wheat. *Can. J. Plant Pathol.* **9**, 188–192.

Commandeur, U. and Huth, W. (1999). Differentiation of strains of wheat dwarf virus in infected wheat and barley plants by means of polymerase chain reaction. *J. Plant Dis. Protect.* **106**, 550–552.

Conti, M. (1972). Investigations on the epidemiology of maize rough dwarf virus. I. Overwintering of virus in its planthopper vector. *Actas Congr. Uniao Fitopatol. Mediterr.* **3**, 11–17.

Conti, M. (1984). Epidemiology and vectors of plant reo-like viruses. *Curr. Top. Vector Res.* **2**, 112–139.

Conti, M. and Masenga, V. (1977). Identification and prevalence of pepper viruses in northwest Italy. *Phytopathol. Z.* **90**, 212–222.

Converse, R.H. and Lister, R.M. (1969). The occurrence and some properties of black raspberry latent virus. *Phytopathology* **59**, 325–333.

Converse, R.H. and Martin, R.R. (1982). Use of the Barbara–Clark (F(ab')$_2$) indirect ELISA test for detection of viruses in small fruits. *Acta Hortic.* **129**, 21.

Converse, R.H. and Tanne, E. (1984). Heat therapy and stolon apex culture to eliminate mild yello-wedge virus from Hood strawberry. *Phytopathology* **74**, 1315–1316.

Cook, A.A., Walker, J.C. and Larson, R.H. (1952). Studies on the disease cycle of black rot of crucifers. *Phytopathology* **42**, 162–167.

Cooke, R. and Penon, P. (1990). *In vitro* transcription from cauliflower mosaic virus promoters by a cell free extract from tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* **14**, 391–405.

Cooley, M.B., Pathirana, S., Wu, H.-J., Kachroo, P. and Klessig, D.F. (2000). Members of the *Arabidopsis HRT/RPP8* family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell* **12**, 663–676.

Cooper, B., Schmitz, I., Rao, A.L.N., Beachy, R.N. and Dodds, J.A. (1996). Cell-to-cell transport of movement-defective cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses in transgenic plants expressing heterologous movement protein genes. *Virology* **216**, 208–213.

Cooper, J.I. (1971). The distribution in Scotland of tobacco rattle virus and its nematode vectors in relation to soil type. *Plant Pathol.* **20**, 51–58.

Cooper, J.I. (1999). Fabaviruses (*Comoviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 531–534. Academic Press, San Diego.

Cooper, J.I. and Harrison, B.D. (1973). Distribution of potato mop-top virus in Scotland in relation to soil and climate. *Plant Pathol.* **22**, 73–78.

Cooper, J.I. and Jones, A.T. (1983). Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. *Phytopathology* **73**, 127–128.

Cooper, J.I. and Mayo, M.A. (1972). Some properties of the particles of three tobravirus isolates. *J. Gen. Virol.* **16**, 285–297.

Cooper, J.L., Jones, R.A.C. and Harrison, B.D. (1976). Field and glasshouse experiments on the control of potato mop top virus. *Ann. Appl. Biol.* **83**, 215–230.

Cope, W.A., Walker, S.K. and Lucas, L.T. (1978). Evaluation of selected white clover clones for resistance to viruses in the field. *Plant Dis. Rep.* **62**, 267–270.

Cornelissen, B.J.C. and Bol, J.F. (1984). Homology between the proteins encoded by tobacco mosaic virus and two tricornaviruses. *Plant Mol. Biol.* **3**, 379–384.

Cornelissen, B.J.C., Brederode, F.T., Moorinann, R.J.M. and Bol, J.F. (1983a). Complete nucleotide sequence of alfalfa mosaic virus RNA1. *Nucl. Acids Res.* **11**, 1253–1265.

Cornelissen, B.J.C., Brederode, F.T., Veeneman, G.H., van Boom, J.H. and Bol, J.F. (1983b). Complete nucleotide sequence of alfalfa mosaic virus RNA2. *Nucl. Acids Res.* **11**, 3019–3025.

Correia, J.-J., Shire, S., Yphantis, D.A. and Schuster, T.M. (1985). Sedimentation equilibrium measurements of the intermediate-size tobacco mosaic virus protein polymers. *Biochemistry* **24**, 3292–3297.

Costa, A.S. and Muller, G.W. (1980). *Tristeza* control by cross-protection: a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Dis.* **64**, 538–541.

Costet, L., Cordelier, S., Dorey, S., Baillieul, F., Fritig, B. and Kauffmann, S. (1999). Relationship between localized acquired resistance (LAR) and the hypersensitive response: HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 655–662.

Cotten, J. (1979). The effectiveness of soil sampling for virus-vector nematodes in MAFF certification schemes for fruit and hops. *Plant Pathol.* **28**, 40–44.

Couch, H.B. (1955). Studies on the seed transmission of lettuce mosaic virus. *Phytopathology* **45**, 63–70.

Coutts, R.H.A. (1986). New threats to crops from changing farm practices. *Nature (Lond.)* **322**, 594.

Coutts, R.H.A. and Buck, K.W. (1985). DNA and RNA polymerase activities of nuclei and hypotonic extracts of nuclei isolated from tomato golden mosaic virus infected tobacco leaves. *Nucl. Acids Res.* **13**, 7881–7897.

Coutts, R.H.A., Rigden, J.E., Slabas, A.R., Lomonossoff, G.P. and Wise, P.J. (1991). The complete nucleotide sequence of tobacco necrosis virus strain D. *J. Gen. Virol.* **72**, 1521–1529.

Covey, S.N. (1986). Amino acid sequence homology in gag region of reverse transcribing elements and the coat protein gene of cauliflower mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* **14**, 623–633.

Covey, S.N. (2000). Silencing gene silencing genes. *Trends Plant Sci.* **5**, 405–406.

Covey, S.N. and Al-Kaff, N.S. (2000). Plant DNA viruses and gene silencing. *Plant Mol. Biol.* **43**, 307–322.

Covey, S.N. and Hull, R. (1981). Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detection of transcripts, properties, and location of the gene encoding the virus inclusion body protein. *Virology* **111**, 463–474.

Covey, S.N. and Turner, D.S. (1993). Changes in populations of cauliflower mosaic virus DNA and RNA forms during turnip callus proliferation *J. Gen. Virol.* **74**, 1887–1893.

Covey, S.N., Turner, D. and Mulder, G. (1983). A small DNA molecule containing covalently linked ribonucleotides originates from the large intergenic region of the cauliflower mosaic virus genome. *Nucl. Acids Res.* **11**, 251–264.

Covey, S.N., Turner, D.S., Lucy, A.P. and Saunders, K. (1990). Host regulation of the cauliflower mosaic virus multiplication cycle. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 1633–1637.

Covey, S.N., Al-Kaff, N.S., Lángara, A. and Turner, D.S. (1997). Plants combat infection by gene silencing. *Nature* **385**, 781–782.

Crane, P.R. and Lidgard, S. (1989). Angiosperm diversification and paleolatitudinal gradients in cretaceous floristic diversity. *Science* **246**, 675–678.

Crane, P.R., Friis, E.M. and Pedersen, K.R. (1995). The origin and early diversification of angiosperms. *Nature* **374**, 27–33.

Creamer, R. and Falk, B.W. (1990). Direct detection of transcapsidated barley yellow dwarf luteovirus in doubly infected plants. *J. Gen. Virol.* **71**, 211–217.

Creamer, R., He, X. and Styer, W.E. (1993). Transmission of sorghum stunt mosaic rhabdovirus by the leafhopper vector, *Graminella sonora* (Homoptera: Cicadellidae). *Plant Dis.* **81**, 63–65.

Creaser, E.H., Gibbs, A.J. and Pares, R.D. (1987). The amino acid composition of the coat protein of a tobamovirus from an Australian *Capsicum* crop. *Aust. Plant Pathol.* **16**, 85–87.

Crick, F.H.C. and Watson, J.D. (1956). Structure of small viruses. *Nature (London)* **177**, 473–475.

Crill, P., Hagedorn, D.J. and Hanson, E.W. (1971). An artificial system for differentiating strains of alfalfa mosaic virus. *Plant Dis. Rep.* **55**, 127–130.

Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M.C. and Carrington, J.C. (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* **7**, 549–559.

Cronshaw, J., Hoefert, L. and Esau, K. (1966). Ultrastructural features of *Beta* leaves infected with beet yellows virus. *J. Cell Biol.* **31**, 429–443.

Crosbie, E.S. and Matthews, R.E.F. (1974a). Effects of TYMV infection on leaf pigments in *Brassica pekinensis* Rupr. *Physiol. Plant Pathol.* **4**, 379–387.

Crosbie, E.S. and Matthews, R.E.F. (1974b). Effects of TYMV infection on growth of *Brassica pekinensis* Rupr. *Physiol. Plant Pathol.* **4**, 389–400.

Crowley, N.C. (1959). Studies on the time of embryo infection by seed-transmitted viruses. *Virology* **8**, 116-123.

Crowson, R.A., Ralfe, W.D.I., Smart, J., Waterson, C.D., Willey, E.C. and Wootton, R.J. (1967). *Arthropoda: Chelicerata, Pyconogonida, Palaeoisopus, Myriapoda and Insecta. The Fossil Record*, pp. 499–534. Geological Society, London.

Crowther, R.A. and Klug, A. (1975). Structural analysis of macromolecular assemblies by image reconstruction from electron micrographs. *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 161–182.

Crowther, R.A., Geelen, J.L.M.C. and Mellema, J.E. (1974). A three-dimensional image reconstruction of cowpea mosaic virus. *Virology* **57**, 20–27.

Crum, C., Johnson, J.D., Nelson, A. and Roth, D. (1988). Complementary oligodeoxynucleotide mediated inhibition of tobacco mosaic virus RNA translation *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* **16**, 4569–4581.

Cuillel, M., Herzog, M., and Hirth, L. (1979). Specificity of *in vitro* reconstitution of bromegrass mosaic virus. *Virology* **95**, 146–153.

Cuillel, M., Jacrot, B. and Zulauf, M. (1981). A T = 1 capsid formed by protein of brome mosaic virus in the presence of trysin. *Virology* **110**, 63–72.

Cuillel, M., Berthet-Colominas, C., Krop, B., Tardieu, A., Vachette, P. and Jacrot, B. (1983). Self-assembly of brome mosaic virus capsids: kinetic studies using neutron and X-ray solution scattering. *J. Mol. Biol.* **164**, 645–650.

Culver, J.N. (1997). Viral avirulence genes. In: G. Stacey and N.T. Keen (eds) *Plant–Microbe Interactions*, Vol. 2, pp. 196–219. Chapman and Hall, New York.

Culver, J.N. and Dawson, W.O. (1989). Point mutations in the coat protein gene of tobacco mosaic virus induce hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2**, 209–213.

Culver, J.N., Lindebeck, A.G.C. and Dawson, W.O. (1991). Virus–host interactions: induction of chlorotic and necrotic responses in plants by tobamoviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**, 193–217.

Culver, J.N., Stubbs, G. and Dawson, W.O. (1994). Structure–function relationship between tobacco mosaic virus coat protein and hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris*. *J. Mol. Biol.* **242**, 130–138.

Culver, J.N., Dawson, W.O., Plonk, K. and Stubbs, G. (1995). Site-directed mutagenesis confirms the involvement of carboxylate groups in the disassembly of tobacco mosaic virus. *Virology* **206**, 724–730.

Cuozzo, M., O'Connell, K.M., Kaniewski, W., Fang, R.-X., Chua, N.-H. and Turner, N.E. (1988). Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Biotechnology* **6**, 549–557.

Cusack, S., Miller, A., Krijgsmann, P.C.J. and Mellema, J.E. (1981). An investigation of the structure of alfalfa mosaic virus by small-angle neutron scattering. *J. Mol. Biol.* **145**, 525–543.

Cusack, S., Oostergetel, G.T., Krijgsman, P.C.J. and Mellema, J.E. (1983). Structure of the Top a–t component of alfalfa mosaic virus: a non-icosahedral virion. *J. Mol. Biol.* **171**, 139–155.

Cutt, J.R., Harpster, M.H., Dixon, D.C., Carr, J.P., Dunsmuir, P. and Klessig, D.F. (1989). Disease response to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR1b gene. *Virology* **173**, 89–97.

da Graça, J.V. and Martin, M.M. (1976). An electron microscope study of hypersensitive tobacco infected with tobacco mosaic virus at 32 °C. *Physiol. Plant Pathol.* **8**, 215–219.

da Graça, J.V. and Martin M.M. (1981). Ultrstructural changes in avocado leaf tissue infected with advocado sunblotch. *Phytopathol. Z.* **102**, 185–194.

Dahal, G., Hibino, H. and Saxena, R.C. (1990a). Association of leafhopper feeding behaviour with transmission of rice tungro to susceptible and resistant rice cultivars. *Phytopathology* **80**, 371–377.

Dahal, G., Hibino, H., Cabunagan, R.C., Tionco, E.M., Flores, Z.M. and Aguiero, V.M. (1990b). Changes in cultivar reaction due to changes in 'virulence' of the leafhopper vector. *Phytopathology* **80**, 659–665.

Dahal, G., Hughes, J.d'A., Thottappilly, G. and Lockhart, B.E.L. (1998). Effect of temperature on symptom expression and reliability of banana streak badnavirus detection in naturally infected plantain and banana (*Musa* spp.). *Plant Dis.* **82**, 16–21.

Dahl, D. and Knight, C.A. (1963). Some nitrous acid-induced mutants of tomato atypical mosaic virus. *Virology* **21**, 580–586.

Dale, J.L. (1987). Banana bunchy top: an economically important tropical plant virus disease. *Adv. Virus Res.* **33**, 301–325.

Dale, J.L. and Harding, R.M (1998). Banana bunchy top disease: current and future strategies for control. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 659–669. APS Press, St. Paul, MN.

Daley, P.F. (1995). Chlorophyll fluorescence analysis and imaging plant stress and disease. *Can. J. Plant Pathol.* **17**, 167–173.

Dall, D.J., Randles, J.W. and Francki, R.I.B. (1989). The effect of alfalfa mosaic virus on productivity of annual barrel medic, *Medicago truncatula*. *Aust. J. Agric. Res.* **40**, 807–815.

Dall, D.J., Anzola, J.V. Xu, Z. and Nuss, D.L. (1990). Structure-specific binding of wound tumor virus transcript by a host factor. *Virology* 179, 599–608.

Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**, 543–553.

Damsteegt, V.D. and Hewings, A.D. (1986). Comparative transmission of soybean dwarf virus by three geographically diverse populations of *Aulacorthum* (= *Acyrthosiphon*) *solani*. *Ann. Appl. Biol.* **109**, 453–463.

Damsteegt, V.D. and Hewings, A.D. (1987). Relationships between *Aulacorthum solani* and soybean dwarf virus: effect of temperature on transmission. *Phytopatholology* **77**, 515–518.

Dangl, J.L., Dietrich, R.A. and Richberg, M.H. (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant–microbe interactions. *Plant Cell* **8**, 1793–1807.

Danthinne, X., Seurinck, J., van Montagu, M., Pleij, C.W.A. and van Emmelo, J. (1991). Structural similarities between the RNAs of two satellites of tobacco necrosis virus. *Virology* **185**, 605–614.

D'Arcy, C.J. and Mayo, M.A. (1997). Proposals for changes in luteovirus taxonomy and nomenclature. *Arch. Virol.* **142**, 1285–1287.

D'Arcy, C.J., Domier, L.L. and Mayo, M.A. (2000). Family *Luteoviridae*. In: M.H.V. van Regenmortel *et al.* (eds) *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, pp. 775–784. Academic Press, San Diego.

Dardick, C.D. and Culver, J.N. (1997). Tobamovirus coat proteins: elicitors of the hypersensitive response in *Solanum melongena* (eggplant). *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 776–778.

Dardick, C.D., Taraporewala, Z., Lu, B. and Culver, J.N. (1999). Comparison of tobamovirus coat protein structural features that affect elicitor activity in pepper, eggplant and tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 247–251.

Daròs, J.A. and Carrington, J.C. (1997). RNA-binding activity of NIa proteinase of tobacco etch potyvirus. *Virology* **237**, 327–336

Daròs, J.A. and Flores, R. (1995). Identification of a retroviroid-like element from plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 6856–6860.

Daròs, J.A., Marcos, J.F., Hernández, C. and Flores, R. (1994). Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 12813–12817.

Daròs, J.-A., Schaad, M.C. and Carrington, J.C. (1999). Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *J. Virol.* **73**, 8732–8740.

Dasgupta, I., Hull, R., Eastop, S., Poggi-Pollini, C., Blakebrough, M., Boulton, M.I. and Davies, J.W. (1991). Rice tungro bacilliform virus DNA independently infects rice after *Agrobacterium*-mediated transfer. *J. Gen. Virol.* **72**, 1215–1221.

Dasgupta, R., Garcia II, B.H. and Goodman, R.M. (2001). Systemic spread of an RNA insect virus in plants expressing plant viral movement protein genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 4910–4915.

Datema, K.P., Spruijt, R.B., Verduin, J.M. and Hemminga, M.A. (1987). Interaction of plant viruses and viral coat proteins with model membranes. *Biochemistry* **26**, 6217–6223.

Daubert, S.D. and Bruening, G. (1984). Detection of genome-linked proteins of plant and animal viruses. In: K. Maramarosch and H. Koprowski (eds) *Methods in Virology*, pp. 347–379. Academic Press, Orlando, FL.

Daubert, S.D., Richins, R., Shepherd, R.J. and Gardner, R.C. (1982). Mapping of the coat protein gene of cauliflower mosaic virus by its expression in a prokaryotic system. *Virology* **122**, 444–449.

Daubert, S.D., Schoeiz, J., Debao, L. and Shepherd, R.J. (1984). Expression of disease symptoms in cauliflower mosaic virus genomic hybrids. *J. Mol. Appl. Genet.* **2**, 537–547.

Davies, D.L. and Clark, M.F. (1983). A satellite-like nucleic acid of arabis mosaic virus associated with hop nettlehead disease. *Ann. Appl. Biol.* **103**, 439–448.

Davies, J.W. (1979). Translation of plant virus ribonucleic acids in extracts from eukaryotic cells. In T.C. Hall and J.W. Davies (eds) *Nucleic Acids in Plants*, Vol. 2, pp. 111–149. CRC Press, West Palm Beach, FL.

Davies, J.W., Townsend, R. and Stanley, J. (1987). The structure, expression, functions and possible exploitation of geminivirus genomes. *Adv. Plant Sci.* **4**, 31–52.

Davis, P.H. and Heywood, V.H. (1963). *Principles of Angiosperm Taxonomy*. Oliver & Boyd, Edinburgh.

Davis, R.E. and Sinclair, W.A. (1998). Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology* **88**, 1372-1376.

Davis, R.F. and Shifriss, O. (1983). Natural virus infection in silvery and non-silvery lines of *Cucurbita pepo*. *Plant Dis.* **67**, 379–380.

Dawe, V.H. and Kuhn, C.W. (1983). Isolation and characterization of a double-stranded DNA mycovirus infecting the aquatic fungus *Rhizidiomyces*. *Virology* **130**, 21–28.

Dawson, G.W., Griffiths, D.C., Pickett, J.A., Plumb, R.T., Woodcock, C.M. and Zhong-Ning, Z. (1988). Structure/activity studies on aphid alarm pheromone derivatives and their field use against transmission of barley yellow dwarf virus. *Pestic. Sci.* **22**, 17–30.

Dawson, J.R.O. (1967). The adaptation of tomato mosaic virus to resistant tomato plants. *Ann. Appl. Biol.* **60**, 209–214.

Dawson, W.O. (1972). Enhancement of the infectivity, nucleoprotein concentration and multiplication rate of cowpea chlorotic mottle virus in manganese-treated cowpea. *Phytopathology* **62**, 1206–1209.

Dawson. W.O. (1976). The sequence of inhibition of tobacco mosaic virus synthesis by actinomycin D, 2-thiouracil and cycloheximide in a synchronous infection. *Phytopathology* **66**, 177–181.

Dawson, W.O. (1978a). Isolation and mapping of replication-deficient, temperature-sensitive mutants of cowpea chlorotic mottle virus. *Virology* **90**, 112–118.

Dawson, W.O. (1978b). Time-course of actinomycin D inhibition of tobacco mosaic virus multiplication relative to the rate of spread of the infection. *Intervirology* **9**, 304–309.

Dawson, W.O. (1983). Tobacco mosaic virus protein synthesis is correlated with double-stranded RNA synthesis and not single-stranded RNA synthesis. *Virology* **125**, 314–323.

Dawson, W.O. (1999). Tobacco mosaic virus virulence and avirulence. *Proc. R. Soc. Lond. B* **354**, 645–651.

Dawson, W.O. and Boyd, C. (1987a). Modifications of nucleic acid precursors that inhibit plant virus multiplication. *Phytopathology* **77**, 477–480.

Dawson, W.O. and Boyd, C. (1987b). TMV protein synthesis is not translationally regulated by heat shock. *Plant Mol. Biol.* **8**, 145–149.

Dawson, W.O. and Bubrick, P. (1989). The interactions of modified viruses with their hosts. In: *Molecular Biology of Plant–Pathogen Interactions*, pp. 117–127. Alan R. Liss, New York.

Dawson, W.O. and Jones, G.E. (1976). A procedure for specifically selecting temperature-sensitive mutants of tobacco mosaic virus. *Mol. Gen. Genet.* **145**, 307–309.

Dawson, W.O. and Korhonen-Lehto, K.M. (1990). Regulation of tobamovirus gene expression. *Adv. Virus Res.* **38**, 307–342.

Dawson, W.O. and Schlegel, D.E. (1976). The sequence of inhibition of TMV synthesis by actinomycin D, 2-thiouracil and cycloheximide in a synchronous infection. *Phytopathology* **66**, 177–181.

Dawson, W.O., Schlegel, D.E., and Lung, M.C.Y. (1975). Synthesis of tobacco mosaic virus in intact tobacco leaves systemically inoculated by differential temperature treatment. *Virology* **65**, 565–573.

Dawson, W.O., Beck, D.L., Knorr, D.A. and Grantham, G.L. (1986). cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 1832–1836.

Dawson, W.O., Bubrick, P. and Grantham, G.L. (1988). Modification of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication movement and symptomatology. *Phytopathology* **78**, 783–789.

Dawson, W.O., Lewandowski, D.J., Hilf, M.E. *et al.* (1989). A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. *Virology* **172**, 285–292.

Dax, E., Livneh, O., Aliskevicius, E. *et al.* (1998). A SCAR marker linked to the ToMV resistance gene, *Tm2²*, in tomato. *Euphytica* **101**, 73–77.

Day, A.G., Bejarano, E.R., Buck, K.W., Burrell, M. and Lichtenstein, C.P. (1991). Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 6721–6725.

Day, N. and Maiti, I.B. (1999). Structure and promoter/leader deletion analysis of mirabilis mosaic virus (MMV) full-length promoter in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **40**, 771–782.

de Assis, F.M. and Sherwood, J.L. (2000). Evaluation of seed transmission of turnip yellow mosaic virus and tobacco mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* **90**, 1233–1238.

de Bokx, J.A. (ed.) (1972). *Viruses of Potatoes and Seed-Potato Production*. Pudoc, Wageningen.

de Bokx, J.A. and Piron, P.G.M. (1981). Transmission of potato spindle tuber viroid by aphids. *Neth. J. Plant Pathol.* **87**, 31–34.

de Bortoli, M. and Roggero, P. (1985). Electrophoretic desorption of intact virus from immunoadsorbent. *Microbiologica* **8**, 113–121.

de Fazio, G., Kudamatsu, M. and Vicente, M. (1980). Virazole pretreatments for the prevention of tomato spotted wilt virus (TSWV) systemic infection in tobacco plants *Nicotiana tabacum*, L. 'White Burley'. *Fitopatol. Bras.* **5**, 343–394.

de Feyter, R., Young, M., Schroeder, K., Dennis, E.S. and Gerlach, W. (1996). A ribozyme gene and an antisense gene are equally effective in conferring resistance to tobacco mosaic virus on transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **250**, 329–338.

de Graaf, M., Coscoy, L. and Jaspars, E.M.J. (1993). Localization and biochemical characterization of alfalfa mosaic virus replication complexes. *Virology* **194**, 878–881.

de Haan, P., Wagemakers, L., Peters, D. and Goldbach, R. (1990). The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J. Gen. Virol.* **71**, 1001–1007.

de Haan, P., Gielen, J.J.L., Prins, M. *et al.* (1992). Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. *Biotechnology* **10**, 1133–1137.

de Jaeger, G., De Wilde, C., Eeckhout, D., Fiers, E. and Depicker, A. (2000). The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant Mol. Biol.* **43**, 419–428.

de Jager, C.P. (1976). Genetic analysis of cowpea mosaic virus mutants by supplementation and reassortment tests. *Virology* **70**, 151–163.

de Jager, S.M. and Murray, J.A.H. (1999). Retinoblastoma proteins in plants. *Plant Mol. Biol.* **41**, 295–299.

de Jong, W. and Ahlquist, P. (1995). Host-specific alterations in viral RNA accumulation and infection spread in a brome mosaic virus isolate with an expanded host range. *J. Virol.* **69**, 1485–1492.

de Jong, W., Forsyth, A., Leister, D., Gebhardt, C. and Baulcombe, D.C. (1997). A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome V. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 153–162.

de Kochko, A. (1999). Plant pararetroviruses—cassava vein mosaic virus. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1285–1289. Academic Press, San Diego.

de la Cruz, A., Lopez, L., Tenllado, F. *et al.* (1997). The coat protein is required for elicitation of *Capsicum* L^2 gene-mediated resistance against the tobamoviruses. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 107–113.

de Laat, A.M.M. and van Loon, L.C. (1983). The relationship between stimulated ethylene production and symptom expression in virus-infected tobacco leaves. *Physiol. Plant Pathol.* **22**, 261–273.

de Leeuw, G.T.N. (1975). An easy and precise method to measure the length of flexuous virus particles from electron micrographs. *Phytopathol. Z.* **82**, 347–351.

de Mejia, M.V.G., Hiebert, E., Purcifull, D.E., Thornbury, D.W. and Pirone, T.P. (1985). Identification of potyviral amorphous inclusion protein as a non-structurlal virus-specific protein related to helper component. *Virology* **142**, 34–43.

de Miranda, J., Hernandez, M., Hull, R. and Espinoza, A.M. (1994). Sequence analysis of rice hoja blanca virus RNA 3. *J. Gen. Virol.* **75**, 2127–2132.

de Miranda, J., Hull, R. and Espinoza, A.M. (1995a). Sequence of the PV2 gene of rice hoja blanca tenuivirus RNA-2. *Virus Genes.* **10**, 205–209.

de Miranda, J., Stevens, M., de Bruyne, E., Smith, H.G., Bird, C. and Hull, R. (1995b). Sequence comparison and classification of beet luteovirus isolates. *Arch. Virol.* **140**, 2183–2200.

de Tapia, M., Himmelbach, A. and Hohn, T. (1993). Molecular dissection of the cauliflower mosaic virus translation transactivator. *EMBO J.* **12**, 3305–3314.

de Varennes, A., Davies, J.W., Shaw, J.G. and Maule, A.J. (1985). A reappraisal of the effect of actinomycin D and cordycepin on the multiplication of cowpea mosaic virus in cowpea protoplasts. *J. Gen. Virol.* **66**, 817–825.

de Wijs, J.J. (1975). The distribution of passionfruit ringspot virus in its main host plants in Ivory Coast. *Neth. J. Plant Pathol.* **81**, 144–148.

de Wijs, J.J. (1980). The characteristics of mineral oils in relation to their inhibitory activity on the aphid transmission of potato virus Y. *Neth. J. Plant Pathol.* **86**, 291–300.

de Wijs, J.J. and Suda-Bachmann, F. (1979). The long-term preservation of potato virus Y and watermelon mosaic virus in liquid nitrogen in comparison to other preservation methods. *Neth. J. Plant Pathol.* **85**, 23–29.

de Zoeten, G.A. (1966). California tobacco rattle virus, its intracellular appearance, and the cytology of the infected cell. *Phytopathology* **56**, 744–754.

de Zoeten, G.A. (1968). Application of scanning microscopy in the study of virus transmission of aphids. *J. Virol.* **2**, 745–751.

de Zoeten, G.A. (1991). Risk assessment: do we let history repeat itself? *Phytopathology* **81**, 585–586.

de Zoeten, G.A. (1995). Plant virus infection: another point of view. *Adv. Bot. Res.* **21**, 105–124.

de Zoeten, G.A. and Gaard, G. (1969a). Distribution and appearance of alfalfa mosaic virus in infected plant cells. *Virology* **39**, 768–774.

de Zoeten, G.A. and Gaard, G. (1969b). Possibilities for inter- and intracellular translocation of some icosahedral plant viruses. *J. Cell Biol.* **40**, 814–823.

de Zoeten, G.A., Gaard, G. and Diez, F.B. (1972) Nuclear vesiculation associated with pea enation mosaic virus-infected plant tissue. *Virology* **48**, 638–647.

de Zoeten, G.A., Assink, A.M. and van Kanimen, A. (1974). Association of cowpea mosaic virus-induced double-stranded RNA with a cytopathological structure in infected cells. *Virology* **59**, 341–355.

de Zoeten, G.A., Powell, C.A., Gaard, G. and German, T.L. (1976). *In situ* localization of pea enation mosaic virus double-stranded ribonucleic acid. *Virology* **70**, 459–469.

de Zoeten, G.A., Penswick, J.R., Horisberger, M.A., Ahl, P., Schultze, M. and Hohn, T. (1989). The expression localization and effect of a human interferon in plants. *Virology* **172**, 213–222.

de Zoeten, G.A., Demler, S.A., Rucker, D.G., Ziegler, A., Robinson, D.J. and Murant, A.F. (1994). Replicative cross-support of the satellite RNAs of the groundnut rosette disease complex and pea enation mosaic virus. *Abstracts of the Annual Meeting of the American Society of Virology*, 1994, Madison, Wisconsin, USA, p. 206.

Dean, J.L. (1979). Sugarcane mosaic virus: shape of the inoculum–infection curve near the origin. *Phytopathology* **69**, 179–181.

Deiman, B.A.L.M. and Pleij, C.W.A. (1997). Pseudoknots: a vital feature in viral RNA. *Semin. Virol.* **8**, 166–175.

Deiman, B.A.L.M., Séron, K., Jaspars, E.M.J. and Pleij, C.W.A. (1997a). Efficient transcription of the tRNA-like structure of turnip yellow mosaic virus by a template-dependent and specific RNA polymerase obtained by a new procedure. *J. Virol. Meth.* **64**, 181–195.

Deiman, B.A.L.M., Kortlever, R.M. and Pleij, C.W.A. (1997b). The role of the pseudoknot at the 3′ end of turnip yellow mosaic virus RNA in minus-strand synthesis by the viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **71**, 5990–5996.

Deiman, B.A.L.M., Verlaan, W.G. and Pleij, C.W.A. (2000). *In vitro* transcription of the turnip yellow mosaic virus RNA polymerase: a comparison with the alfalfa mosaic virus and brome mosaic virus replicases. *J. Virol.* **74**, 264–271.

Dekker, E.L., Doré, I., Porta, C. and van Regenmortel, M.H.V. (1987). Conformational specificity of monoclonal antibodies used in the diagnosis of tomato mosaic virus. *Arch. Virol.* **94**, 191–203.

Dekker, E.L., Pinner, M.S., Markham, P.G. and van Regenmortel, M.H.V. (1988). Characterisation of maize streak virus isolates from different plant species by polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **69**, 983–990.

Dekker, E.L., Porta, C. and van Regenmortel, M.H.V. (1989). Limitations of different ELISA procedures for localizing epitopes in viral coat protein subunits. *Arch. Virol.* **105**, 269–286.

Dekker, E.L., Woolston, C.J., Xue, Y., Cox, B. and Mullineaux, P.M. (1991). Transcript mapping reveals different expression strategies for bicistronic RNAs of the geminivirus wheat dwarf virus. *Nucl. Acids Res.* **19**, 4075–4081.

Del Bene, G., Dallai, R. and Marchini, D. (1991). Ultrastructure of the midgut and the adhering tubular salivary glands of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: *Thripidae*). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **20**, 15–24.

Delannay, X., Fraley, R.T., Rogers, S.G. *et al.* (1989). Development and field testing of crops improved through genetic engineering. In: J.J. Cohen (ed.) *Strengthening Collaboration in Biotechnology. International Agricultural Research and the Private Sector*, pp. 185–195. Agency for International Development, Washington, DC.

Delauney, A.J., Tabaeizadeh, Z. and Verma, D.P.S. (1988). A stable bifunctional antisense transcript inhibiting gene expression in transgenic plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 4300–4304.

Delwiche, C.F., Graham, L.E. and Thomson, N. (1989). Lignin-like compounds and sporopollenin in Coleochaete, an algal model for land plant ancestry. *Science* **245**, 399–401.

Demler, S.A. and de Zoeten, G.A. (1989). Characterization of a satellite RNA associated with pea enation mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **70**, 1075–1084.

Demler, S.A., Rucker, D.G. and de Zoeten, G.A. (1993). The chimeric nature of the genome of pea enation mosaic virus: the independent replication of RNA 2. *J. Gen. Virol.* **74**, 1–14.

Demler, S.A., Borkhsenious, O.N., Rucker, D.G. and de Zoeten, G.A. (1994a). Assessment of the autonomy of replicative and structural functions encoded by the luteo-phase of pea enation mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **75**, 997–1007.

Demler, S.A., Rucker, D.G., Nooruddin, L. and de Zoeten, G.A. (1994b). Replication of the satellite RNA of pea enation mosaic virus is controlled by RNA 2-encoded functions. *J. Gen. Virol.* **75**, 1339–1406.

Demler, S.A., de Zoeten, G.A., Adam, G. and Harris, K.F. (1996a). Pea enation mosaic virus: properties and aphid transmission. In: B.D. Harrison and A.F Murant (eds) *The Plant Viruses*, Vol. 5, *Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes*, pp. 303–344. Plenum Press, New York.

Demler, S.A., Rucker, D.G., de Zoeten, G.A., Ziegler, A., Robinson, D.J. and Murant, A.F. (1996b). The satellite RNAs associated with the groundnut rosette disease complex and pea enation mosaic virus: sequence similarities and ability of each other's helper to support their replication. *J. Gen. Virol.* **77**, 2847–2855.

Dempsey, D.A., Wobbe, K.K. and Klessig, D.F. (1993). Resistance and susceptible responses of *Arabidopsis thaliana* to turnip crinkle virus. *Phytopathology* **83**, 1021–1029.

Dempsey, D.A., Pathirana, M.S., Wobbe, K.K. and Lessig, D.F. (1997). Identification of an *Arabidopsis* locus required for resistance to turnip crinkle virus. *Plant J.* **11**, 301–311.

Dempsey, D'M.A., Shah, J. and Klessig, D.F. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**, 547–575.

Demski, J.W., Bays, D.C. and Kahn, M.A. (1986). Simple latex agglutination test for detecting flexuous rod-shaped viruses in forage legumes. *Plant Dis.* **70**, 777–779.

Denloye, A.O., Homer, R.B. and Hull, R. (1978). Circular dichroism studies on turnip rosette virus. *J. Gen. Virol.* **41**, 77–85.

Denna, D.W. and Alexander, M.B. (1975). The isoperoxidases of *Cucurbita pepo* L. In: C.L. Markert (ed.) *Isozymes*, Vol. 2, pp. 851–864. Academic Press, New York.

Deom, C.M., Oliver, M.J. and Beachy, R.M. (1987). The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* **237**, 389–394.

Deom, C.M., He, X.Z., Beachy, R.N. and Weissinger, A.K. (1994). Influence of heterologous tobamovirus movement protein and chimeric-movement protein genes on cell-to-cell and long-distance movement. *Virology* **205**, 198–209.

Deom, C.M., Quan, S. and He, X.Z. (1997). Replicase proteins as determinants of phloem-dependent long-distance movement of tobamoviruses in tobacco. *Protoplasma* **199**, 1–8.

Depicker, A. and van Montagu, M. (1997). Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 373–382.

Derrick, K.S. (1973). Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology* **56**, 652–653.

Derrick, P.M. and Nelson, R.S. (1999). Plasmodesmata and long-distance virus movement. In: A.J.E. van Bel and W.J.P. van Kesteren (eds) *Plasmodesmata: Structure, Function, Role in Cell Communications*, pp. 315–339. Springer-Verlag, Berlin.

Derrick, P.M., Barker, H. and Oparka, K.J. (1992). Increase in plasmodesmatal permeability during cell-to-cell spread of tobacco rattle virus from individually inoculated cells. *Plant Cell* **4**, 1405–1412.

Desbiez, C., David, C., Mettouchi, A., Laufs, J. and Gronenborn, B. (1995). Rep protein of tomato yellow leafcurl geminivirus has an ATPase activity required for viral DNA replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 5640–5644.

Desjardins, P.R., Drake, R.J. and French, J.V. (1969). Transmission of citrus ringspot virus to citrus and non-citrus hosts by dodder (*Campestris subinclusa*). *Plant Dis. Rep.* **53**, 947–948.

Dessens, J.T. and Lomonossoff, G.P. (1991). Mutational analysis of the putative catalytic triad of the cowpea mosaic virus 24K protease. *Virology* **184**, 738–746.

Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* **12**, 387–395.

Devic, M., Jaegle, M. and Baulcombe, D. (1989). Symptom production on tobacco and tomato is determined by two distinct domains of the satellite RNA of cucumber mosaic virus (strain Y). *J. Gen. Virol.* **70**, 2765–2774.

Dewar, A.M. and Smith, H.G. (1999). Forty years of forecasting virus yellow incidence in sugar beet. In: H.G. Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp. 231–243. CAB International, Wallingford, UK.

Dey, N. and Maiti, I.B. (1999). Structure and promoter/leader deletion analysis of mirabilis mosaic virus (MMV) full-length transcript promoter in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **40**, 771–782.

Di, R., Dinesh-Kumar, S.P. and Miller, W.A. (1993). Translational frameshifting by barley yellow dwarf RNA (PAV serotype) in *Escherichia coli* and in eukaryotic cell-free extracts. *Molec. Plant-Microbe Interact.* **6**, 444–452.

Di Franco, A. and Martelli, G.P. (1987). Some observations on the ultrastructure of galinsoga mosaic virus infections. *Phytopathol. Mediterr.* **26**, 54–56.

Di Franco, A., Russo, M. and Martelli, G.P. (1984). Ultrastructure and origin of cytoplasmic multivesicular bodies induced by carnation Italian ringspot virus. *J. Gen. Virol.* **65**, 1233–1237.

Diaco, R., Hill, J.H., Hill, G.K., Tachibana, H. and Durand, D.P. (1985). Monoclonal antibody-based biotin–avidin ELISA for the detection of soybean mosaic virus in soybean seeds. *J. Gen. Virol.* **66**, 2089–2094.

Diaco, R., Lister, R.M., Hill, J.H. and Durand, D.P. (1986). Detection of homologous and heterologous barley yellow dwarf virus isolates with monoclonal antibodies in serologically specific electron microscopy. *Phytopathology* **76**, 225–230.

Diaz-Avalos, R. and Caspar, D.L.D. (1998). Structure of the stacked disk aggregate of tobacco mosaic virus protein. *Biophys J.* **74**, 595–603.

Diaz-Ruiz, J.R. and Kaper, J.M. (1983). Nucleotide sequence relationships among thirty peanut stunt virus isolates determined by competition hybridization. *Arch. Virol.* **75**, 277–281.

Dickerson, P.E. and Trim, A.R. (1978). Conformational states of cowpea chlorotic mottle virus ribonucleic acid components. *Nucl. Acids Res.* **5**, 987–998.

Diekmann, M. and Putter, C.A. (1996). *FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm*, No. 15, Musa, 2nd ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Plant Genetic Resource Institute, Rome.

Diener, T.O. (1971). Potato spindle tuber 'virus'. IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology* **45**, 411–428.

Diener, T.O. (1981). Are viroids escaped introns? *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **78**, 5014–5015.

Diener, T.O. (1987a). Biological properties. In: T.O. Diener (ed.) *The Viroids*, pp. 9–35. Plenum, New York.

Diener, T.O. (ed.) (1987b). *The Viroids*. Plenum, New York.

Diener, T.O. (1989). Circular RNAs: relics of precellular evolution? *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 9370–9374.

Diener, T.O. (1993). The viroid: big punch in a small package. *Trends Microbiol.* **1**, 289–294.

Diener, T.O. (1996). Origin and evolution of viroids and viroid-like satellite RNAs. *Virus Genes* **11**, 119–131.

Diener, T.O. (1999). Viroids and the nature of viroid diseases. *Arch Virol.* **15**, 203–220.

Diener, T.O. and Hadidi, A. (1977). Viroids. *Compr. Virol.* **11**, 285–337.

Diener, T.O. and Jenifer, F.G. (1964). A dependable local lesion assay for turnip yellow mosaic virus. *Phytopathology* **54**, 1258–1260.

Dietzgen, R.G. (1986). Immunological properties and biological function of monoclonal antibodies to tobacco mosaic virus. *Arch. Virol.* **87**, 73–86.

Dietzgen, R.G. and Francki, R.I.B. (1987). Nonspecific binding of immunoglobulins to coat proteins of certain plant viruses in immunoblots and indirect ELISA. *J. Virol. Methods* **15**, 159–164.

Dietzgen, R.G. and Sander, E.-M. (1982). Monoclonal antibodies against a plant virus. *Arch. Virol.* **74**, 197–204.

Dietzgen, R.G. and Zaitlin, M. (1986). Tobacco mosaic virus coat protein and the large subunit of the host protein ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase share a common antigenic determinant. *Virology* **155**, 262–266.

Diez, J., Ishikawa, M., Kaido, M. and Ahlquist, P. (2000). Identification and characterization of a host protein required for efficient template selection in viral RNA replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 3913–3918.

Dijkstra, J. (1962). On the early stages of infection by tobacco mosaic virus in *Nicotiana glutinosa* L. *Virology* **18**, 142–143.

Dijkstra, J. (1966). Multiplication of TMV in isolated epidermal tissue of tobacco and *Nicotiana glutinosa* leaves. In: A.B.R. Beemster and J. Dijkstra (eds) *Viruses of Plants*, pp. 19–21. North-Holland, Amsterdam.

Dijkstra, J. and de Jager, C.P. (1998). *Practical Plant Pathology: Protocols and Exercises*. Springer-Verlag, Berlin

Dijkstra, J., Bruin, G.C.A., Burgers, A.C. *et al.* (1977). Systemic infection of some *N*-gene-carrying *Nicotiana* species and cultivars after inoculation with tobacco mosaic virus. *Neth. J. Plant Pathol.* **83**, 41–59.

Dinant, S. and Lot, H. (1992). Lettuce mosaic virus. *Plant Pathol.* **41**, 528–542.

Dinant, S., Janda, M., Kroner, P. and Ahlquist, P. (1993). Bromovirus RNA replication and transcription require compatability between the polymerase- and helicase-like RNA synthesis proteins. *J. Virol.* **67**, 7181–7189.

Dinant, S., Kusiak, C., Cailleteau, B. *et al.* (1998). Field resistance against potato virus Y infection using natural and genetically engineered resistance genes. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 377–382.

Dinesh-Kumar, S.P. and Baker, B.J. (2000). Alternatively spliced *N* resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 1908–1913.

Dinesh-Kumar, S.P. and Miller, W.A. (1993). Control of start codon choice on a plant viral RNA encoding overlapping genes. *Plant Cell* **5**, 679–692.

Dinesh-Kumar, S.P., Whitham, S., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B. (1995). Transposon tagging of tobacco mosaic virus resistance gene *N*: its possible role in TMV-*N*-mediated signal transduction pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 4175–4180.

Dinesh-Kumar, S.P., Tham, W.-H. and Baker, B.J. (2000). Structure–function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 14789–14794.

Ding, B. (1998). Intercellular protein trafficking through plasmodesmata. *Plant Mol. Biol.* **38**, 279–310.

Ding, B., Haudenshield, J.S., Hull, R.J., Wolf, S., Beachy, R.N. and Lucas, W.J. (1992). Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **4**, 915–928.

Ding, B., Kwon, M.-O., Hammond, R. and Owens, R. (1997). Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant J.* **12**, 931–936.

Ding, S.-W. (2000). RNA silencing. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 152–156.

Ding, S.-W., Keese, P. and Gibbs, A. (1989). Nucleotide sequence of the ononis yellow mosaic tymovirus genome. *Virology* **172**, 555–563.

Ding, S.-W., Howe, J., Keese, P. *et al.* (1990). The tymobox, a sequence shared by most tymoviruses: its use in molecular studies of tymoviruses. *Nucl. Acids Res.* **18**, 1181–1187.

Ding, S.-W., Anderson, B.J., Haase, H.R. and Symons, R.H. (1994). New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology* **198**, 593–601.

Ding, S.-W., Li, W.X. and Symons, R.H. (1995a). A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant virus facilitates long-distance virus movement. *EMBO J.* **14**, 5762–5772.

Ding, S.-W., Shi, B.J., Li, W.X. and Symons, R.H. (1996a). An inter-specific species hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 7470–7474.

Ding, X.S., Shintaku, M.H., Arnold, S.A. and Nelson, R.S. (1995b). Accumulation of mild and severe strains of tobacco mosaic virus in minor veins of tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 32–40.

Ding, X.S., Shintaku, M.H., Carter, S.A. and Nelson, R.S. (1996b). Invasion of minor veins of tobacco leaves inoculated with tobacco mosaic virus mutants defective in phloem-dependent movement. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 11155–11160.

Ding, X.S., Carter, S.A., Deom, C.M. and Nelson, R.S. (1998). Tobamovirus and potyvirus accumulation in minor veins of inoculated leaves from representatives of the *Solanaceae* and *Fabaceae*. *Plant Physiol.* **116**, 125–136.

Ding, X.S., Flasinski, S. and Nelson, R.S. (1999). Infection of barley by brome mosaic virus is restricted predominantly to cells in and associated with veins through a temperature-dependent mechanism. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **12**, 615–623.

Ding, X.S., Boydiston, C.M. and Nelson, R.S. (2000). Potential roles of plant guttation in BMV transmission in nature. *Phytopathology* **90**, S19.

Dinter-Gottlieb, G. (1986). Viroids and virusoids are related to group I introns. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 6250–6254.

Dixon, A.F.G. (1973). *The Biology of Aphids*. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.

Dixon, E.A. and Harrison, M.J. (1990). Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv. Genet.* **28**, 166–233.

Dixon, L.K. and Hohn, T. (1984). Initiation of translation of the cauliflower mosaic virus genome from a polycistronic mRNA: evidence from deletion mutagenesis. *EMBO J.* **3**, 2731–2736.

Dodds, J.A. (1993). dsRNA in diagnosis. In: R.E.F. Matthews (ed.) *Diagnosis of Plant Virus Diseases*, pp. 273–294. CRC Press, Boca Raton, FL.

Dodds, J.A. (1998). Satellite tobacco mosaic virus. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 295–310.

Dodds, J.A. (1999). Satellite tobacco mosaic virus. In: P.K. Vogt and A.O. Jackson (eds) *Satellites and Defective RNAs*, pp. 145–157. Springer, Berlin.

Dodds, J.A. and Hamilton, R.I. (1974). Masking of the RNA genome of tobacco mosaic virus by the protein of barley stripe mosaic virus in doubly infected barley. *Virology* **59**, 418–427.

Dodds, J.A. and Hamilton, R.I. (1976). Structural interactions between viruses as a consequence of mixed infections. *Adv. Virus Res.* **20**, 33–86.

Dodds, J.A., Morris, T.J., and Jordan, R.L. (1984). Plant viral double-stranded RNA. *Annu. Rev. Phytopathol.* **22**, 151–168.

Dodds, J.A., Lee, S.Q. and Tiffany, M. (1985). Cross protection between strains of cucumber mosaic virus: effect of host and type of inoculum on accumulation of virions and double-stranded RNA of the challenge strain. *Virology* **144**, 301–309.

Dodds, J.A., Jarupat, T., Lee, J.G. and Roistacher, C.N. (1987). Effects of strain, host, time of harvest and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **77**, 442–447.

Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. and Asuyama, H. (1967). Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches broom, aster yellows, or Paulownia witches broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* **33**, 259–266.

Dolenc, J., Vihar, B. and Dermastia, M. (2000). Systemic infection with potato virus Y-NTN alters the structure and activity of the shoot meristem in a susceptible potato cultivar. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* **56**, 33–38.

Dolja, V.V., Sokolova, N.A., Tjulkina, L.G. and Atabekov, J.G. (1979). A study of barley stripe mosaic virus (BSMV) genome: II. Translation of individual RNA species of two BSMV strains in a homologous cell-free system. *Mol. Gen. Genet.* **175**, 93–97.

Dolja, V.V., Lunina, N.A., Leiser, R.-M., Stanarius, T., Belzhelarskaya, S.N., Kozlov, Yu.V., and Atabekov, J.G. (1983). A comparative study on the *in vitro* translation products of individual RNAs from two-, three-, and four-component strains of barley stripe mosaic virus. *Virology* **127**, 1–14.

Dolja, V.V., McBride, H.J. and Carrington, J.C. (1992). Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of β-glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 10208–10212.

Dolja, V.V., Karasev, A.V. and Koonin, E.V. (1994). Molecular biology and evolution of closteroviruses: sophisticated build-up of large RNA genomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 261–285.

Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A. and Carrington, J.C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* **206**, 1007–1016.

Dollet, M., Accotto, G.P., Lisa, V., Menissier, J. and Boccardo, G. (1986). A geminivirus, serologically related to maize streak virus, from *Digitaria sanguinalis* from Vanuatu. *J. Gen. Virol.* **67**, 933–937.

Domeier, M.E., Morse, D.P., Knight, S.W., Portereiko, M., Bass, B.L. and Mango, S.E. (2000). A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **289**, 1928–1930.

Domier, L.L., Shaw, J.G. and Rhoads, R.E. (1987). Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulimoviral proteins. *Virology* **158**, 20–27.

Domingo, E. (1999). Quasispecies. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, pp. 1431–1436. Academic Press, San Diego.

Domingo, E. and Holland, J.-J. (1988). High error rates, population equilibrium and evolution of RNA replication systems. In: E. Domingo, J.-J. Holland and P. Ahlquist (eds) *RNA Genetics*, Vol. 3, pp. 3–36. CRC Press, Boca Raton, FL.

Domingo, E. and Holland, J.-J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 151–178.

Domingo, E., Holland, J., Biebricher, C. and Eigen, M. (1995). Quasispecies: the concept and the word. In: A.J. Gibbs, C.H. Calisher and F. Garcia-Arenal (eds) *Molecular Basis for Virus Evolution*, pp. 181–191. Cambridge University Press, Cambridge.

Domingo, E., Escarmis, C., Menéndez-Arias, L. and Holland, J. – J. (1999a). Viral quasispecies and fitness variations. In: E. Domingo, R. Webster and J. Holland (eds) *Origin and Evolution of Viruses*, pp. 141–161. Academic Press, London.

Domingo, E., Webster, R. and Holland, J. (1999b). Origin and evolution of viruses. Academic Press, London.

Dominguez, D.I., Hohn, T. and Schmidt-Puchta, W. (1996). Cellular proteins bind to multiple sites of the leader region of cauliflower mosaic virus 35S RNA. *Virology* **226**, 374–383.

Dominguez, D.I., Ryabova, L.A., Pooggin, M.M., Schmidt-Puchta, W., Fütterer, J. and Hohn, T. (1998). Ribosome shunting in cauliflower mosaic virus: identification of an essential and sufficient structural element. *J. Biol. Chem.* **273**, 3669–3678.

Donald, R.G.K. and Jackson, A.O. (1996). RNA-binding activities of barley stripe mosaic virus gamma b fusion proteins. *J. Gen. Virol.* 77, 879–888.

Donald, R.G.K., Petty, I.D.T., Zhou, H. and Jackson, A.O. (1985). Properties of genes influencing barley stripe mosaic virus movement phenotypes. In: D.D. Bills *et al.* (eds) *Biotechnology and Plant Protection: Viral Pathogenesis and Disease Resistance*, pp. 115–150. World Scientific Publishing, Singapore.

Doncaster, J.P. and Gregory, P.H. (1948). The spread of virus diseases in the potato crop. *G. B. Agric. Res. Counc. Rep. Ser.* **7**, 1–189.

Dong, X. (1998). SA, JA, ethylene and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 316–323.

Donofrio, J.C., Kuchta, J., Moore, R. and Kacymarczyk, W. (1986). Properties of a solubilized replicase isolated from corn infected with maize dwarf mosaic virus. *Can. J. Microbiol.* **32**, 637–644.

Donson, J., Morris-Krsinich, B.A.M., Mullineaux, P.M., Boulton, M.I. and Davies, J.W. (1984). A putative primer for second strand DNA synthesis of maize streak virus is virion associated. *EMBO J.* **3**, 3069–3073.

Donson, J., Gunn, H.V., Woolston, C.J. *et al.* (1988). *Agrobacterium*-mediated infectivity of cloned digitaria streak virus DNA. *Virology* **162**, 248–250.

Donson, J., Kearney, C.M., Hilf, M.E. and Dawson, W.O. (1991). Systemic infection of a bacterial gene by tobacco mosaic virus-based vector. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 7204–7208.

Doolittle, R.F. (ed.) (1990). *Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences*. Academic Press, San Diego.

Doolittle, R.F., Feng, D.-F., Johnson, M.S. and McClure, M.A. (1989) Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *Q. Rev. Biol.* **64**, 1–30.

Dore, I., Dekker, E.L., Porta, C. and van Regenmortel, M.H.V. (1987a). Detection by ELISA of two tobamoviruses in orchids using monoclonal antibodies. *J. Phytopathol.* **20**, 317–326.

Dore, I., Altschuh, D., Al-Moudallal, Z. and van Regenmortel, M.H.V. (1987b). Immunochemical studies of tobacco mosaic virus: VII. Use of comparative surface accessibility of residues in antigenically related viruses for delineating epitopes recognised by monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* **24**, 1351–1358.

Dore, I., Weiss, E., Altschuh, D. and van Regenmortel, M.H.V. (1988). Visualization by electron microscopy of the location of tobacco mosaic virus epitopes reacting with monoclonal antibodies in enzyme immunoassay. *Virology* **162**, 279–289.

Dore, I., Ruhlmann, C., Oudet, P., Cahoon, M., Caspar, D.L.D. and van Regenmortel, M.H.V. (1989). Polarity of binding of monoclonal antibodies to tobacco mosaic virus rods and stacked disks. *Virology* **176**, 25–29.

Dorokhov, Y.L., Alexandrova, N.M., Miroshnichenko, N.A. and Atabekov, J.G. (1983). Isolation and analysis of virus-specific ribonucleoprotein of tobacco mosaic virus-infected tobacco. *Virology* **127**, 237–252.

Dorokhov, Y.L., Alexandrova, N.M., Miroshnichenko, N.A. and Atabekov, J.G. (1984). Stimulation by aurintricarboxylic acid of tobacco mosaic virus-specific RNA synthesis and production of informosome-like infection-specific ribonucleoprotein. *Virology* **135**, 395–405.

Dorokhov, Y.L., Mäkinen, K., Frolova, O.Y. *et al.* (1999). A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Lett.* **461**, 223–228.

Dorssers, L., van der Meer, J., van Kammen, A. and Zabel, P. (1983). The cowpea mosaic virus RNA replication complex and the host-encoded RNA-dependent RNA polymerase–template complex are functionally different. *Virology* **125**, 155–174.

Dorssers, L., van der Krol, S., van der Meer, J., van Kammen, A. and Zabel, P. (1984). Purification of cowpea mosaic virus RNA replication complex: identification of a viral-encoded 110,000-dalton polypeptide responsible for RNA chain elongation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **81**, 1951–1955.

Dougherty, W.G. (1983). Analysis of viral RNA isolated from leaf tissue infected with tobacco etch virus. *Virology* **131**, 473–481.

Dougherty, W.G. and Carrington, J.C. (1988). Expression and function of potyviral gene products. *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**, 123–143.

Dougherty, W.G. and Hiebert, E. (1980). Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as a product of the potyvirus genome. *Virology* **104**, 174–182.

Dougherty, W.G. and Hiebert, E. (1985). Genome structure and gene expression of plant RNA viruses. In: J.W. Davies (ed.) *Plant Molecular Biology*, Vol. 2, pp. 23–81. CRC Press, Boca Raton, FL.

Dougherty, W.G. and Parks, T.D. (1995). Transgenes and gene silencing: telling us something new? *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 399–405.

Dougherty, W.G. and Semler, B.L. (1993). Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**, 781–822

Dougherty, W.G., Wilis, L. and Johnston, R.F. (1985). Topographic analysis of tobacco etch virus capsid protein epitopes. *Virology* **144**, 66–72.

Dougherty, W.G., Parks, T.D., Cary, S.M., Bazan, J.F. and Fletterick, R.J. (1989). Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase. *Virology* **172**, 302–310.

Douthit, L.B. and McGuire, J.M. (1975). Some effects of temperature on *Xiphinema americanum* and infection of cucumber by tobacco ringspot virus. *Phytopathology* **65**, 134–138.

Dowson Day, M.J., Ashurst, J.L., Mathias, S.F., Watts, J.W., Wilson, T.M.A. and Dixon, R.A. (1993). Plant viral leaders influence expression of a reporter gene in tobacco. *Plant. Mol. Biol.* **23**, 97–109.

Drake, J.W. and Holland, J.J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 13910–13913.

Drake, J.R., Charlesworth, B., Charlesworth, D. and Crow, J.F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics* **148**, 1667–1686.

Draper, J. and Scott, R. (1991). Gene transfer to plants. In: D. Grierson (ed.) *Plant Genetic Engineering*, pp. 38–81. Blackie, Glasgow.

Dreher, T.W. (1999). Functions of the 3'-untranslated regions of positive strand RNA viral genomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**, 151–174.

Dreher, T.W. and Weiland, J.J. (1994). Preferential replication of defective turnip yellow mosaic virus RNAs that express the 150-kDa protein in *cis*. *Archiv. Virol.* **S9**, 195–204.

Driedonks, R.A., Krijgsman, P.C.J. and Mellema, J.E. (1977). Alfalfa mosaic virus protein polymerization. *J. Mol. Biol.* **113**, 123–140.

Driedonks, R.A., Tjok Joe, M.K. K. and Mellema, J.E. (1980). Application of band centrifugation to the study of the assembly of alfalfa mosaic virus. *Biopolymers* **19**, 575–595.

Drugeon, G., Urcuqui-Inchima, S., Milner, M. *et al.* (1999). The strategies of plant virus gene expression: models of economy. *Plant Sci.* **148**, 77–88.

Druka, A. and Hull, R. (1998). Variation in rice tungro viruses: further evidence for two rice tungro bacilliform virus strains and possibly several rice tungro spherical virus variants. *J. Phytopathol.* **146**, 175–178.

Druka, A., Burns, T., Zhang, S.L. and Hull, R. (1996). Immunological characterization of rice tungro spherical virus coat proteins and differentiation of isolates from the Philippines and India. *J. Gen. Virol.* **77**, 1975–1983.

Dry, I., Krake, L.R., Rigden, J.E. and Rezaian, M.A. (1997). A novel subviral agent associated with a geminivirus: the first report of a DNA satellite. *Proc. Natl Acad. Sc. USA* **94**, 7088–7093.

Dry, I., Krake, L., Mullineaux, P. and Rezaian, A. (2000). Regulation of tomato leaf curl viral gene expression in host tissues. *Mol. Plant Microb. Interact.* **13**, 529–537.

Du Plessis, D.H. and Smith, P. (1981). Glycosylation of the cauliflower mosaic virus capsid polypeptide. *Virology* **109**, 403–408.

Duarte, E.A., Clarke, D.K., Moya, A., Elena, S.F., Domingo, E. and Holland, J. (1993). Million-trillionfold amplification of single RNA virus particles fails to overcome the Muller's ratchet effect. *J. Virol.* **67**, 3620–3623.

Dudits, D., Marcy, E., Praznovszky, T., Olah, Z., Gyorgyey, J. and Cella, R. (1987). Transfer of resistance traits from carrot into tobacco by asymmetric somatic hybridization: regeneration of fertile plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 8434–8438.

Duffus, J.E. (1971). Role of weeds in the incidence of virus diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 319–340.

Duffus, J.E. (1973). The yellowing virus diseases of beet. *Adv. Virus Res.* 18, 347–386.

Duffus, J.E. (1987). Durability of resistance. *Ciba Found. Symp.* **133**, 196–199.

Dugdale, B., Beethan, P.R., Becker, D.K., Harding, R.M. and Dale, J.L. (1998). Promoter activity associated with the intergenic regions of banana bunchy top virus DNA-1 to -6 in transgenic tobacco and banana cells. *J. Gen. Virol.* **79**, 2301–2311.

Duijsings, D., Kormelink, R. and Goldbach, R. (1999). Alfalfa mosaic virus RNAs serve as cap donors for tomato spotted wilt virus transcription during coinfection of *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol.* **73**, 5172–5175.

Dumas, P., Moras, D., Florentz, C., Giegé, R., Verlaan, P., van Belkum, A. and Pleij, C.W.A. (1987). 3D graphics modelling of the tRNA-like 3'-end of turnip yellow mosaic virus RNA: Structural and functional implications. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **4**, 707–728.

Dunez, J. (1983). *Indexing of Virus and Virus-like Diseases of Fruit Trees.* International Society of Horticultural Science, Castet IMP, Bordeaux.

Dunigan, D.D. and Zaitlin, M. (1990). Capping activity of tobacco mosaic virus RNA: analysis of viral-coded guanyltransferase-like activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 7770–1186.

Dunigan, D.D., Dietzen, R.G., Schoelz, J.E. and Zaitlin, M. (1988). Tobacco mosaic virus particles contain ubiquitinated coat protein subunits. *Virology* **165**, 310–312.

Dunn, D.B. and Hitchborn, J.H. (1965). The use of bentonite in the purification of plant viruses.. *Virology* **25**, 171–192.

Dupin, A., Collot, D., Peter, R. and Witz, J. (1985). Comparison between the primary structure of the coat proteins of turnip yellow mosaic virus and eggplant mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **66**, 2571–2579.

Duran-Vila, N. and Semancik, J.S. (1990). Variations in the 'cross protection' effect between two strains of citrus exocortis viroid. *Ann. Appl. Biol.* **117**, 367–377.

Duran-Vila, N., Romero-Durbán, J. and Hernández, M. (1996). Detection and eradication of chrysanthemum stunt in Spain. *OEPP Bull.* **26**, 399–405.

Durham, A.C.H. (1978). The roles of small ions especially calcium in virus disassembly takeover and transformation. *Biomedicine* **28**, 307–313.

Durham, A.C.H. and Bancroft, J.B. (1979). Cation binding by papaya mosaic virus and its protein. *Virology* **93**, 246–252.

Durham, A.C.H. and Finch, J.T. (1972). Structures and roles of the polymorphic forms of tobacco mosaic virus protein. II. Electron microscope observations of the larger polymers. *J. Mol. Biol.* **67**, 307–314.

Durham, A.C.H., Finch, J.T. and Klug, A. (1971). States of aggregation of tobacco mosaic virus protein. *Nature (London), New Biol.* **229**, 37–42.

Durham, A.C.H., Hendry, D.A. and von Wechmar, M.B. (1977). Does calcium ion binding control plant virus disassembly. *Virology* **77**, 524–533.

Durham, A.C.H., Witz, J. and Bancroft, J.B. (1984). The semipermeability of simple spherical virus capsids. *Virology* **133**, 1–8.

Durrant, I. (1990). Light-based detection of biomolecules. *Nature* **346**, 297–300.

Dutcher, S.K. (2001). The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 49–54.

Dzianott, A.M. and Bujarski, J.J. (1991). The nucleotide sequence and genome organization of RNA-1 segment in two bromoviruses—broad bean mottle virus and cowpea chlorotic mottle virus. *Virology* **185**, 553–562.

Eagles, R.M., Balmori-Melián, E., Beck, D.L., Gardner, R.C. and Forster, R.L.S. (1994). Characterization of NTPase, RNA-binding and RNA-helicase activities of the cytoplasmic inclusion protein of tamarillo mosaic potyvirus. *Eur. J. Biochem.* **224**, 677–684.

Easton, L.M., Lewis, G.D. and Pearson, M.N. (1997). Virus-like particles associated with dyeback symptoms in the brown alga *Ecklonia radiata*. *Dis. Aquatic Org.* **30**, 217–222.

Eastop, V.F. (1977). Worldwide importance of aphids as virus vectors. In: K.F. Harris and K. Maramorosch (eds) *Aphids as Virus Vectors*, pp. 3–62. Academic Press, New York.

Ebbels, D.L. (1979). A historical review of certification schemes for vegetatively propagated crops in England and Wales. *ADAS Q. Rev.* **32**, 21–58.

Edelbaum, O., Ilan, N., Grafi, G. *et al.* (1990). Two antiviral proteins from tobacco: purification and characterization by monoclonal antibodies to human β-interferon. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 588–592.

Edskes, H.K., Kiernan, J.M. and Shepherd, R.J. (1996). Efficient translation of distal cistrons of a polycistronic mRNA of a plant pararetrovirus requires a compatible interaction between the mRNA 3′ end and the proteinaceous *trans*-activator. *Virology* **224**, 564–567.

Edwards, M.C. (1995). Mapping of the seed transmission determinants of barley stripe mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**, 906–915.

Edwards, M.C., Zhang, Z. and Weiland, J.J. (1997). Oat blue dwarf marafivirus resembles the tymoviruses in sequence, genome organization and expression strategy. *Virology* **232**, 217–229.

Edwards, M.C., Gonsalves, D. and Provvidenti, R. (1983). Genetic analysis of cucumber mosaic virus in relation to host resistance location of determinants for pathogenicity to certain legumes and *Lactuca saligno*. *Phytopathology* **73**, 269–273.

Edwardson, J.R. (1974a). Some properties of the potato virus Y-group. *Fla. Agric. Exp. Sta. Monogr.* **4**, 398 pp.

Edwardson, J.R. (1974b). Host ranges of viruses in the PVY group. *Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr.* **5**, 225 pp.

Edwardson, J.R. and Christie, R.G. (1983). Cytoplasmic cylindrical and nucleolar inclusions induced by potato virus-A. *Phytopathology* **73**, 290–293.

Edwardson, J.R. and Corbett, M.K. (1962). A virus-like syndrome in tomato caused by a mutation. *Am. J. Bot.* **49**, 571–574.

Edwardson, J.R., Christie, R.G. and Ko, N.J. (1984). Potyvirus cylindrical inclusions: subdivision-IV. *Phytopathology* **74**, 1111–1114.

Edwardson, J.R., Christie, R.G., Purcifull, D.E. and Petersen, M.A. (1993). Inclusions in diagnosing plant virus diseases. In: R.E.F. Matthews (ed.) *Diagnosis of Plant Virus Diseases*, pp. 101–128. CRC Press, Boca Raton, FL.

Eecen, H.G., van Dierendonck, J.H., Pleij, C.W.A., Mandel, M. and Bosch, L. (1985). Hydrodynamic properties of RNA: effect of multivalent cations on the sedimentation behaviour of turnip yellow mosaic virus RNA. *Biochemistry* **24**, 3610–3617.

Egan, B.T. and Hall, P. (1983). Monitoring the Fiji disease epidemic in sugar cane at Bundaberg, Australia. In: R.T. Plumb and J.M. Thresh (eds) *Plant Virus Epidemiology*, pp. 287–296. Blackwell, Oxford.

Egan, B.T., Ryan, C.C. and Franki, R.I.B. (1989). Fiji disease. In: C. Ricaud, B.T. Egan, A.G. Gillespie and C.G. Hughes (eds) *Diseases of Sugar Cane: Major Diseases*, pp. 263–287. Elsevier, Amsterdam.

Eggen, R. and van Kammen, A. (1988). RNA replication in comoviruses. In: P. Ahlquist, J. Holland and E. Dimingo (eds) *RNA Genetics*, Vol. 1, pp. 49–69. CRC Press, Boca Raton.

Eggen, R., Kaan, A., Goldbach, R. and van Kammen, A. (1988). Cowpea mosaic virus RNA replication in crude membrane fractions from infected cowpea and *Chenopodium amaranticolor*. *J. Gen. Virol.* **69**, 2711–2720.

Eggen, R., Verver, J., Wellink, J., Pleij, K., van Kammen, A. and Goldbach, R. (1990). Analysis of sequences involved in cowpea mosaic virus RNA replication using site specific mutants. *Virology* **173**, 456–464.

Eglinton, G. and Hamilton, R.J. (1967). Leaf epicuticular waxes. *Science* **156**, 1322–1335.

Ehlers, K., Binding, H. and Kollmann, R. (1999). The formation of symplastic domains by plugging of plasmodesmata: a general event in plant morphogenesis? *Protoplasma* **209**, 181–192.

Ehlers, U. and Paul, H.-L. (1986). Characterisation of the coat proteins of different types of barley yellow mosaic virus by polyacrylamide gel electrophoresis and electro-blot immunoassay. *J. Phytopathol.* **115**, 294–304.

Ehresmann, B., Briand, J.-P., Reinbolt, J. and Witz, J. (1980). Identification of binding sites of turnip yellow mosaic virus protein and RNA by crosslinks induced *in situ*. *Eur. J. Biochem.* **108**, 123–129.

Ehresmann, C., Baudin, F., Mougel, M., Romby, P., Ebel, J.-P. and Ehresmann, B. (1987). Probing the structure of RNAs in solution. *Nucl. Acids Res.* **15**, 9109–9128.

Eichler, W. (1948). Some rules on ectoparasitism. *Ann. Mag. Nat. Hist. Ser.* **12**, 588–598.

Eigen, M. (1993). Viral quasispecies. *Sci. Am.* **July**, 32–39.

Eldredge, N. (1985). *Time Frames. The Rethinking of Darwinian Evolution and the Theory of Punctuated Equilibria*. Simon and Schuster, New York.

Elliot, M.S., Cromray, H.L., Zettler, F.W. and Carpenter, W.R. (1987). A mosaic disease of wax myrtle associated with a new species of eryophyid mite. *HortScience* **22**, 258–260.

Elliott, R.M. (1999). *Bunyaviridae*: replication. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 212–216. Academic Press, San Diego.

Ellsbury, M.M., Backus, E.A. and Ullman, D.E. (eds) (1994). *History, Development and Application of AC Electronic Feeding Monitors*. Entomological Society of America, Lanham, Maryland.

Elmer, J.S., Brand, L., Sunter, G., Gardiner, W.E., Bisaro, D.M. and Rogers, S.G. (1988a). Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucl. Acids Res.* **16**, 7043–7060.

Elmer, J.S., Sunter, G., Gardiner, W.E., Brand, L., Browning, C.K., Bisaro, D.M. and Rogers, S.G. (1988b). *Agrobacterium*-mediated inoculation of plants with tomato golden mosaic virus DNAs. *Plant Mol. Biol.* **10**, 225–234.

Elmer, S. and Rogers, S.G. (1990). Selection for wild type size derivatives of tomato golden mosaic virus during systemic infection. *Nucl. Acids Res.* **18**, 2001–2006.

Elnagar, S. and Murant, A.F. (1976). The role of the helper virus, anthriscus yellows, in the transmission of parsnip yellow fleck virus by the aphid *Cavariella aegopodii*. *Ann. Appl. Biol.* **84**, 169–181.

Emery, V.C. and Bishop, D.H.L. (1987). Characterization of Punta Toro S mRNA species and identification of an inverted complementary sequence in the intergenic region of Punta Toro phlebovirus ambisense S RNA that is involved in mRNA transcription termination. *Virology* **156**, 1–11.

English, J.J., Mueller, E. and Baulcombe, D.C. (1996). Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* **8**, 179–188.

English, J.J., Davenport, G.F., Elmayan, T., Vaucheret, H. and Baulcombe, D.C. (1997). Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant J.* **12**, 597–603.

Erhardt, M., Morant, M., Ritzenhaler, C. *et al.* (2000). P42 movement protein of beet necrotic yellow vein virus is targeted by the movement proteins p13 and p15 to punctate bodies associated with plasmodesmata. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **13**, 520–528.

Erickson, F.L., Holzberg, S., Calderon-Urrea, A. *et al.* (1999). The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the *N*-mediated defense response in tobacco. *Plant J.* **18**, 67–75.

Erickson, J.W. and Rossmann, M.G. (1982). Assembly and crystallization of a $T = 1$ icosahedral particle from trypsinized Southern bean mosaic virus coat protein. *Virology* **116**, 128–136.

Erokhina, T.N., Zinovkin, R.A., Vitushkina, M.V., Jelkmann, W. and Agranovsky, A.A. (2000). Detection of beet yellows closterovirus methyltransferase-like and helicase-like proteins *in vivo* using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **81**, 597–603.

Eşanu, V., and Dumitrescu, M. (1971). A comparative study of isoperoxidases of tobacco as influenced by TMV infection and genetic constitution. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **6**, 31–35.

Esau, K. (1953). *Plant Anatomy.* John Wiley, New York.

Esau, K. (1956). An anatomist's view of virus diseases. *Am. J. Bot.* **43**, 739–748.

Esau, K. (1979). Beet yellow stunt virus in cells of *Sonchus oleraceus* L. and its relation to host mitochondria. *Virology* **98**, 1–8.

Esau, K. and Cronshaw, J. (1967). Relation of tobacco mosaic virus with host cells. *J. Cell Biol.* **33**, 665–678.

Esau, K. and Hoefert, L.L. (1972). Ultrastructure of sugarbeet leaves infected with beet western yellows virus. *J. Ultrastruct. Res.* **40**, 556–571.

Esau, K. and Hoefert, L.L. (1973). Particles and associated inclusions in sugarbeet infected with the curly top virus. *Virology* **56**, 454–464.

Esau, K. and Hoefert, L.L. (1978). Hyperplastic phloem in sugarbeet leaves infected with the beet curly top virus. *Am. J. Bot.* **65**, 772–783.

Esau, K. and Hoefert, L.L. (1981). Beet yellow stunt virus in the phloem of *Sonchus oleraceus* L. *J. Ultrastruct. Res.* **75**, 326–338.

Esau, K., Cronshaw, J. and Hoefert, L.L. (1966). Organisation of beet-yellows inclusions in leaf cells of *Beta*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **55**, 486–493.

Esau, K., Cronshaw, J. and Hoefert, L.L. (1967). Relation of beet yellows virus to the phloem and to movement in the sieve tube. *J. Cell Biol.* **32**, 71–87.

Escriu, F., Fraile, A. and Garcia-Arenal, F. (2000). Evolution of virulence in natural populations of the satellite RNA of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **90**, 480–485.

Eslick, R.F. and Afanasiev, M.M. (1955). Influence of time of infection with barley stripe mosaic on symptoms, plant yield and seed infection of barley. *Plant Dis. Rep.* **39**, 722–724.

Espinoza, A.M., Medina, V., Hull, R. and Markham, P.G. (1991). Cauliflower mosaic virus gene II product forms distinct inclusion bodies in infected plant cells. *Virology* **185**, 337–344.

Estabrook, E.M., Suyenaga, K., Tsai, J.H. and Falk, B.W. (1996). Maize stripe tenuivirus RNA2 transcripts in plant and insect hosts and analysis of pvc2, a protein similar to the *Phlebovirus* virion membrane glycoproteins. *Virus Genes* **12**, 239–247.

Estabrook, E., Tsai, J. and Falk, B.W. (1998). *In vivo* transfer of barley stripe mosaic hordeivirus ribonucleotides to the 5′ terminus of maize stripe tenuivirus RNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 8304–8309.

Etessami, P., Callis, R., Ellwood, S. and Stanley, J. (1988). Delimitation of essential genes of cassava latent virus DNA2. *Nucl. Acids Res.* **16**, 4811–4829.

Evans, A.C. (1954). Groundnut rosette disease in Tanganyika. I. Field studies. *Ann. Appl. Biol.* **41**, 189–206.

Evans, D. (1985). Isolation of a mutant of cowpea mosaic virus which is unable to grow in cowpeas. *J. Gen. Virol.* **66**, 339–343.

Evans, T.A. and Stephens, C.T. (1989). Increased susceptibility to fusarium crown and root rot in virus-infected asparagus. *Phytopathology* **79**, 253–258.

Evered, D. and Hamett, S. (eds) (1987). *Plant Resistance to Viruses*, Ciba Foundation Symposium, No. 133. Wiley, Chichester, UK.

Faccioli, G. and Marani, F. (1998). Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. Breeding for resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 346–380. APS Press, St. Paul, MN.

Faccioli, G. and Rubies-Autonell, C. (1982). PVX and PVY distribution in potato meristem tips and their eradication by the use of thermotherapy and meristem-tip culture. *Phytopathol. Z.* **103**, 66–75.

Faccioli, G., Rubies-Autonell, C. and Resca, R. (1988). Potato leafroll virus distribution in potato meristem tips and production of virus-free plants. *Potato Res.* **31**, 511–520.

Fagard, M. and Vaucheret, H. (2000). Systemic silencing signal(s). *Plant Mol. Biol.* **43**, 285–293.

Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.-B., Bellini, C. and Vaucheret, H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi and RNA interference in animals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 11650–11654.

Fairall, L., Finch, J.I., Hui, C.-F. and Cantor, C.R. and Butler, P.J.G. (1986). Studies of tobacco mosaic virus reassembly with an RNA tail blocked by a hydridised and cross-linked probe. *Eur. J. Biochem.* **156**, 459–465.

Fakhfakh, H., Vilaine, F., Makni, M. and Robaglia, C. (1996). Cell-free cloning and biolistic inoculation of an infectious cDNA of potato virus Y. *J. Gen. Virol.* **77**, 519–523.

Falk, B.W. (1999). Tenuiviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1756–1764. Academic Press, San Diego.

Falk, B.W. and Tian, T. (1999). Transcapsidation interactions and dependent aphid transmission among luteoviruses, and luteovirus-associated RNAs. In: H.G. Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp. 125–164. CAB International, Wallingford, UK.

Falk, B.W. and Tsai, J.H. (1998). Biology and molecular biology of viruses in the genus *Tenuivirus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 139–163.

Falk, B.W., Duffus, J.E. and Morris, T.J. (1979). Transmission, host range, and serological properties of the viruses that cause lettuce speckles disease. *Phytopathology* **69**, 612–617.

Falk, B.W., Tsai, J.H. and Lommel, S.A. (1987). Differences in levels of detection for the maize stripe virus capsid and major non-capsid proteins in plant and insect hosts. *J. Gen. Virol.* **68**, 1801–1811.

Falk, B.W., Kim, K.S. and Tsai, J.H. (1988). Electron microscopic and physicochemical analysis of a reo-like virus of the planthopper *Peregrinus maidis*. *Intervirology* **29**, 195–206.

Falk, B.W., Klaassen, V.A. and Tsai, J.H. (1989). Complementary DNA cloning and hybridization analysis of maize stripe virus RNAs. *Virology* **173**, 338–342.

Farabaugh, P.J. (1996a). Programmed translational frameshifting. *Microbiol. Rev.* **60**, 103–134.

Farabaugh, P.J. (1996b). Programmed translational frameshifting. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 507–528.

Fargette, D., Fauquet, C. and Thouvenel, J.-C. (1985). Field studies on the spread of African cassava mosaic. *Ann. Appl. Biol.* **106**, 285–294.

Fargette, D., Thouvenel, J.-C. and Fauquet, C. (1987). Virus content of leaves of cassava infected by African cassava mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* **110**, 65–73.

Faulkner, G. and Kimmins, W.C. (1975). Staining reactions of the tissue bordering lesions induced by wounding, tobacco mosaic virus, and tobacco necrosis virus in bean. *Phytopathology* **65**, 1396–1400.

Fauquet, C.M. (1999). Taxonomy, classification and nomenclature of viruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1730–1756. Academic Press, New York.

Fauquet, C.M., and Martelli, G.P. (1995). Up-dated ICTV list of names and abbreviations of viruses, viroids and satellites infecting plants. *Arch. Virol.* **140**, 393–413.

Fauquet, C.M. and Mayo, M.A. (1999). Abbreviations for plant virus names—1999. *Arch. Virol.* **144**, 1249–1272.

Fauquet, C.M., Dejardin, J. and Thouvenel, J.-C. (1986). Evidence that the amino acid composition of the particle proteins of plant viruses is characteristic of the virus group: I. Multidimensional classification of plant viruses. *Intervirology* **25**, 1–13.

Faustmann, O., Kern, R., Sänger, H.L. and Muehlbach, H.-P. (1986). Potato spindle tuber viroid (PSTV) RNA oligomers of (+) and (–) strand polarity are synthesised in potato protoplasts after liposome-mediated infection with PSTV. *Virus Res.* **4**, 213–227.

Favali, M.A., Bassi, M. and Appiano, A. (1974). Synthesis and migration of maize rough dwarf virus in the host cell: an autoradiographic study. *J. Gen. Virol.* **24**, 563–565.

Fazeli, C.F. and Rezaian, M.A. (2000). Nucleotide sequence and organization of ten ORFs in the genome of Grapevine leafroll-associated virus 1 and identification of 3 subgenomic RNAs. *J. Gen. Virol.* **81**, 605–615.

Febres, V.J., Mawassi, A.M., Frank, A. *et al.* (1996). The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* **86**, 1331–1335.

Fedorkin, O.N., Solovyev, A.G., Yelina, N.E. *et al.* (2001). Cell-to-cell movement of potato virus X involves distinct functions of the coat protein. *J. Gen. Virol.* **82**, 449–458.

Felden, B., Florentz, C., McPherson, A. and Giege, R. (1994). A histidine accepting tRNA-like fold at the 3′ end of satellite tobacco mosaic virus RNA. *Nucl. Acids Res.* **22**, 2882–2886.

Felden, B., Florenz, C., Giegé, R. and Westhof, E. (1996). A central pseudoknotted three-way junction imposes tRNA-like mimicry and the orientation of three 5′ upstream pseudoknots in the 3′ terminus of tobacco mosaic virus RNA. *RNA* **2**, 201–212.

Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G.B. and Hunt, A.G. (1998). *In vitro* interactions between a potyvirus-encoded, genome linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **79**, 2043–2049.

Fenby, N.S., Scott, N.W., Slater, A. and Elliott, M.C. (1995). PCR and nonisotopic labelling: techniques for plant virus detection. *Cell. Mol. Biol.* **41**, 639–652.

Fenczik, C.A., Padgett, H.S., Holt, C.A., Casper, S.J. and Beachy, R.N. (1995). Mutational analysis of the movement protein of odontoglossum ringspot virus to identify a host-range determinant. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 666–673.

Feng, D.F., Johnson, M.S. and Doolittle, R.F. (1985). Aligning amino acid sequences—comparison of commonly used methods. *J. Mol. Evol.* **21**, 112–125.

Fenner, F. (1976). Classification and Nomenclature of Viruses. Second Report on the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **7**, 1–115.

Fenner, F. (1979). Portraits of viruses: the poxviruses. *Intervirology* **11**, 137–157.

Fenoll, C., Black, D.M. and Howell, S.H. (1988). The intergenic region of maize streak virus (MSV) contains promoter elements involved in rightward transcription of the viral genome. *EMBO J.* **7**, 1589–1596.

Fenoll, C., Schwarz, J.J., Black, D.M., Schneider, M. and Howell, S.H. (1990). The intergenic region of maize streak virus contains a GC-rich element that activates rightward transcription and binds maize nuclear factors. *Plant Mol. Biol.* **15**, 865–877.

Fernández, A., Laín, S. and García, J.A. (1995). RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*: mapping of an RNA binding domain. *Nucl. Acids Res.* **23**, 1327–1332.

Fernández, A., Guo, H.S., Sáenz, P., Simón-Buela, L., Gómez de Cedrón, M. and García, J.A. (1997). The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus replication. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4474–4480.

Fernandez, I., Candresse, T., Le Gall, O. and Dunez, J. (1999). The 5′ noncoding region of grapevine chrome mosaic nepovirus RNA-2 triggers a necrotic response on three *Nicotiana* spp. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **12**, 337–344.

Fernandez-Gonzalez, O., Renaudin, J. and Bové, J.M. (1980). Infection of chlorophyll-less protoplasts from etiolated chinese cabbage hypocotyls by turnip yellow mosaic virus. *Virology* **104**, 262–265.

Fernow, K.H. (1967). Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology* **57**, 1347–1352.

Figlerowitz, M., Nagy, P.D. and Bujarski, J.J. (1997). A mutation in the putative RNA polymerase gene inhibits nonhomologous, but not homologous, genetic recombination in an RNA virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 2073–2078.

Filho, F.M. de A. and Sherwood, J.L. (2000). Evaluation of seed transmission of turnip yellow mosaic virus and tobacco mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* **90**, 1233–1238.

Filipowicz, W and Kiss, T. (1993). Structure and function of nucleolar snRNPs. *Mol. Biol. Rep.* 18, 149–156.

Finch, J.T. (1972). The hand of the helix of tobacco mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **66**, 291–294.

Finch, J.T. and Holmes, K.C. (1967). Structural studies of viruses. In: K. Maramorosch and H. Koprowski (eds) *Methods in Virology*, Vol. 3, pp. 351–474. Academic Press, New York.

Finch, J.T. and Klug, A. (1966). Arrangement of protein subunits and the distribution of nucleic acid in turnip yellow mosaic virus: II. Electron microscopic studies. *J. Mol. Biol.* **15**, 344–364.

Finch, J.T. and Klug, A. (1967). Structure of broad bean mottle virus: 1. Analysis of electron micrographs and comparison with turnip yellow mosaic virus and its top component. *J. Mol. Biol.* **24**, 289–302.

Finch, J.T., Klug, A. and van Regenmortel, M.H.V. (1967a). The structure of cucumber mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **24**, 303–305.

Finch, J.T., Leberman, R. and Berger, J.E. (1967b). Structure of broad bean mottle virus: II. X-ray diffraction studies. *J. Mol. Biol.* **27**, 17–24.

Finlay, K.W. (1953). Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato. II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. *Aust. J. Biol. Sci.* **6**, 153–163.

Finnegan, E.J., Wang, M.-B. and Waterhouse, P. (2001). Gene silencing: fleshing out the bones. *Curr. Biol.* (in press).

Fischer, D.B. and Rufty, R.C. (1993). Inheritance of partial resistance to tobacco etch virus and tobacco vein mottling virus in burley tobacco cultivar sota 6505. *Plant Dis.* **77**, 662–666.

Fisher, D.B., Wu, Y. and Ku, M.S.B. (1992). Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. *Plant Physiol.* **100**, 1433–1441.

Fitch, W.M. and Margoliash, E. (1967). Construction of phylogenetic trees. *Science* **155**, 279–284.

Fitchen, J.H. and Beachy, R.N. (1993). Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 739–763.

Fitchen, J., Beachy, R.N. and Hein, M.B. (1995). Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine* **13**, 1051–1057.

Fletcher, J.T. and Butler, D. (1975). Strain changes in populations of tobacco mosaic virus from tomato crops. *Ann. Appl. Biol.* **81**, 409–412.

Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275–296.

Flores, R., Di Serio, F. and Hernández, C. (1997). Viroids: the noncoding genomes. *Sem. Virol.* **8**, 65–73.

Flores, R., Daròs, J.-A. and Hernández, C. (2000). Asunviroidae family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Adv. Virus Res.* **55**, 271–323.

Föglein, F.J., Kalpagam, C., Bates, D.C., Premecz, G., Nyitrai, A. and Farkas, G.L. (1975). Viral RNA synthesis is renewed in protoplasts isolated from TMV-infected Xanthi tobacco leaves in an advanced stage of virus infection. *Virology* **67**, 74–79.

Föglein, F.J., Nyitrai, A., Gulyás, A., Premecz, G., Oláh, T. and Farkas, G.L. (1976). Crystalline inclusion bodies are degraded in protoplasts isolated from TMV-infected tobacco leaves. *Phytopathol. Z.* **86**, 266–269.

Fondong, V.N., Pita, J.S., Rey, M.E.C., de Kochko, A., Beachy, R.N. and Fauquet, C.M. (2000). Evidence for synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *J. Gen. Virol.* **81**, 287–297.

Fontes, E.P.B., Luckow, V.A. and Hanley-Bowdoin, L. (1992). A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell* **4**, 597–608.

Fontes, E.P.B., Eagle, P.A., Sipe, P.S., Luckow, V.A. and Hanley-Bowdoin, L. (1994a). Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J. Biol. Chem.* **11**, 8459–8465.

Fontes, E.P.B., Gladfelter, H.J., Schaffer, R.L., Petty, I.T.D. and Hanley-Bowdoin, L. (1994b). Geminivirus replication origins have a molecular organization. *Plant Cell* **6**, 405–416.

Forbes, A.R. (1977). The mouthparts and feeding mechanism of aphids. In: K.F. Harris and K. Maramorosch (eds) *Aphids as Virus Vectors*, pp. 83–103. Academic Press, New York.

Ford, R.E. (1973). Concentration and purification of clover yellow mosaic virus from pea roots and leaves. *Phytopathology* **63**, 926–930.

Forster, A.C. and Symons, R.H. (1987). Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell (Camb.)* **49**, 211–220.

Forster, A.C., Davies, C., Sheldon, C.C., Jeffries, A.C. and Symons, R.H. (1988). Self-cleaving viroid and newt RNAs may only be active as dimers. *Nature (Lond.)* **334**, 265–267.

Forster, R.L.S., Guilford, P.J. and Faulds, D.V. (1987). Characterisation of the coat protein subgenomic RNA of white clover mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **68**, 181–190.

Forster, R.L.S., Beck, D.L., Guilford, P.J., Voot, T.M., Vandolleweerd, C.J. and Andersen, M.T. (1992). The coat protein of white clover mosaic potexvirus has a role in facilitating cell-to-cell transport in the plant. *Virology* **191**, 480–484.

Foster, G.D. and Taylor, S.C. (eds) (1998). *Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance*. Humana Press, Totowa, NJ.

Foster, J.A. and Hadidi, A. (1998). Exclusion of viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 208-229. APS Press, St. Paul, MN.

Foster, J.A. and Ross, A.F. (1975). Properties of the initial tobacco mosaic virus infection sites revealed by heating symptomless inoculated tobacco leaves. *Phytopathology* **65**, 610–616.

Fowlks, E. and Young, R.J. (1970). Detection of heterogeneity in plant viral RNA by polyacrylamide gel electrophoresis. *Virology* **42**, 548–550.

Fox, J.M., Wang, G.J., Speir, J.A. *et al.* (1998). Comparison of the native CCMV virion with *in vitro* assembled CCMV virions by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *Virology* **244**, 212–218.

Fraenkel-Conrat, H. (1956). The role of nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 882–883.

Fraenkel-Conrat, H. (1957). Degradation of tobacco mosaic virus with acetic acid. *Virology* **4**, 1–4.

Fraenkel-Conrat, H. and Singer, B. (1957). Virus reconstitution: II. Combination of protein and nucleic acid from different strains. *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 540–548.

Fraenkel-Conrat, H. and Williams, R.C. (1955). Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **41**, 690–698.

Fraile, A. and García-Arenal, F. (1990). A classification of the tobamoviruses based on the comparison of their '126K' proteins. *J. Gen. Virol.* **71**, 2223–2228.

Fraile, A., Aranda, M.A. and García-Arenal, F. (1995). Evolution of the tobamoviruses. In: A.J. Gibbs, C.H. Calisher and F. García-Arenal (eds) *Molecular Basis for Virus Evolution*, pp. 338–349. Cambridge University Press, Cambridge.

Fraile, A., Malpica, J.M., Aranda, M.A., Rodríguez-Cerezo, E. and García-Arenal, F. (1996). Genetic diversity in tobacco mild green mosaic tobamovirus infecting the wild plant *Nicotiana glauca*. *Virology* **223**, 148–155.

Fraile, A., Escriu, F., Aranda, M.A., Malpica, J.M., Gibbs, A.J. and García-Arenal, F. (1997a). A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *J. Virol.* **71**, 8316–8320.

Fraile, A., Alonso-Prados, J.L., Aranda, M.A., Bernal, J.J., Malpica, J.M. and García-Arenal, F. (1997b). Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus. *J. Virol.* **71**, 934–940.

Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* **21**, 285–294.

Francki, R.I.B. (1973). Plant rhabdoviruses. *Adv. Virus Res.* **18**, 257–345.

Francki, R.I.B. (1980). Limited value of the termal inactivation point, longevity *in vitro* and dilution endpoint as criteria for the characterization, identification and classification of plant viruses. *Inter-virology* **13**, 91–98.

Francki, R.I.B. (1985). Plant virus satellites. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 151–174.

Francki, R.I.B. (1987). Responses of plant cells to virus infection with special references to the sites of RNA replication. In: M.A. Brinton and R.R. Rueckert (eds) *Positive Strand RNA Viruses*, pp. 423–436. Alan R. Liss, New York.

Francki, R.I.B. and Habili, N. (1972). Stabilization of capsid structure and enhancement of immunogenicity of cucumber mosaic virus (Q strain) by formaldehyde. *Virology* **48**, 309–315.

Francki, R.I.B. and Hatta, T. (1980). Cucumber mosaic virus—variation and problems of identification. *Acta Hortic.* **110**, 167–174.

Francki, R.I.B. and Matthews, R.E.F. (1962). Some effects of 2-thiouracil on the multiplication of turnip yellow mosaic virus. *Virology* **17**, 367–380.

Francki, R.I.B. and Miles, R. (1985). Mechanical transmission of sowbane mosaic virus carried on pollen from infected plants. *Plant Pathol.* **34**, 11–19.

Francki, R.I.B. and Randles, J.W. (1972). RNA-dependent RNA polymerase associated with particles of lettuce necrotic yellows virus. *Virology* **47**, 270–275.

Francki, R.I.B. and Randles, J.W. (1978). Composition of the plant rhabdovirus lettuce necrotic yellows virus in relation to its biological properties. In: B.W.J. Mahy and R.D. Barry (eds) *Negative Strand Viruses and the Host Cell*, pp. 223–242.

Francki, R.I.B., Gould, A.R. and Hatta, T. (1980a). Variation in the pathogenicity of three viruses of tomato. *Ann. Appl. Biol.* **96**, 219–226.

Francki, R.I.B., Hatta, T., Boccardo, G. and Randles, J.W. (1980b). The composition of chloris striate mosaic virus, a geminivirus. *Virology* **101**, 233–241.

Francki, R.I.B., Milne, R.G. and Hatta, T. (1985a). *Atlas of Plant Viruses*, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Francki, R.I.B., Milne, R.G. and Hatta, T. (eds) (1985b). *Atlas of Plant Viruses*, Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL.

Francki, R.I.B., Milne, R.G. and Hatta, T. (1985c). Plant *Rhabdoviridae*. In: R.I.B. Francki, R.G. Milne and T. Hatta (eds) *Atlas of Plant Viruses*, Vol. 1, pp. 73–100. CRC Press, Boca Raton, FL.

Francki, R.I.B., Grivell, C.J. and Gibb, K.S. (1986a). Isolation of velvet tobacco mottle virus capable of replication with and without a viroid-like RNA. *Virology* **148**, 381–384.

Francki, R.I.B., Zaitlin, M. and Palukaitis, P. (1986b). *In vivo* encapsulation of potato spindle tuber viroid by velvet tobacco mottle virus particles. *Virology* **155**, 469–473.

Francki, R.I.B., Ryan, C.C., Hatta, T., Rohozinski, J. and Grivell, C.J. (1986c). Serological detection of Fiji disease virus antigens in the planthopper *Perkinsiella saccharricida* and its inefficient ability to transmit the virus. *Plant Pathol.* **35**, 324–328.

Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.I. and Brown, F. (1991). Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report on thee International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, Wien, New York.

Franke, W. (1971). Über die Natur der Ektodesmen und einen Vorschlag zur terminologie. *Ber. Dtsch. Ges.* **84**, 533–537.

Franssen, H., Goldbach, R., Broekhuijsen, M., Moerman, M. and van Kammen, A. (1982). Expression of middle-component RNA of cowpea mosaic virus: *in vitro* generation of a precursor to both capsid proteins by a bottom-component RNA-encoded protease from infected cells. *J. Virol.* **41**, 8–17.

Franssen, H., Moerman, M., Rezelman, G. and Goldbach, R. (1984a). Evidence that the 32,000-dalton protein encoded by bottom-component RNA of cowpea mosaic virus is a proteolytic processing enzyme. *J. Virol.* **50**, 183–190.

Franssen, H., Leunissen, J., Golbach, R., Lomonossoff, G. and Zimmern, D. (1984b). Homologous sequences in non-structural proteins from cowpea mosaic virus and picornaviruses. *EMBO J.* **3**, 855–861.

Franssen, H., Goldbach, R. and van Kammen, A. (1984c). Translation of bottom component RNA of cowpea mosaic virus in reticulocyte lysate: faithful proteolytic processing of primary translation product. *Virus Res.* **1**, 39–49.

Fransz, P.F., Alonso-Blanco, C., Liharska, T.B., Peeters, A.J.M., Zabel, P. and de Jong, J.H. (1996). High resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridisation to extended DNA fibers. *Plant J.* **9**, 421–430.

Franz, A., Makkouk, K.M and Vetten, H.J. (1998). Acquisition, retention and transmission of faba bean necrotic yellows virus by two of its aphid vectors, *Aphis craccivora* (Koch) and *Acyrthosiphon pisum* (Harris). *J. Phytopathol.* **146**, 347–355

Franz, A.W.E., van der Wilk, F., Verbeek, M., Dullemans, A.M. and van den Heuvel, J.F.J.M. (1999). Faba bean necrotic yellows virus (genus *Nanovirus*) requires a helper factor for its aphid transmission. *Virology* **262**, 210–219.

Fraser, L.G. and Matthews, R.E.F. (1979a). Efficient mechanical inoculation of turnip yellow mosaic virus using small volumes of inoculum. *J. Gen. Virol.* **44**, 565–568.

Fraser, L.G. and Matthews, R.E.F. (1979b). Strain-specific pathways of cytological change in individual Chinese cabbage protoplasts infected with turnip yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **45**, 623–630.

Fraser, L.G. and Matthews, R.E.F. (1981). A rapid transient inhibition of leaf initiation induced by turnip yellow mosaic virus infection. *Physiol. Plant Pathol.* **19**, 325–336.

Fraser, L.G. and Matthews, R.E.F. (1983). A rapid transient inhibition of leaf initiation by abscisic acid. *Plant Sci. Lett.* **29**, 67–72.

Fraser, L.G., Keeling, J. and Matthews, R.E.F. (1984). A reduction in starch accumulation in the apical dome of chinese cabbage seedlings following inoculation with turnip yellow mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* **24**, 157–162.

Fraser, R.S.S. (1985). Genetics of host resistance to viruses and of virulence. In: R.S.S. Fraser (ed.) *Mechanisms of Resistance to Plant Disease*, pp. 62–79. Martinus Nijhoff/W. Junk, Dordrecht.

Fraser, R.S.S. (1987a). Resistance to plant viruses. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.* **4**, 1–45.

Fraser, R.S.S. (1987b). *Biochemistry of Virus-Infected Plants*. Research Studies Press, Letchworth, UK.

Fraser, R.S.S. (1988). Virus recognition and pathogenicity: implications for resistance mechanisms and breeding. *Pestic. Sci.* **23**, 267–275.

Fraser, R.S.S. (1992). The genetics of plant–virus interactions: implications for plant breeding. *Euphytica* **63**, 175–185.

Fraser, R.S.S. (1998) Biochemistry of resistance to plant viruses. Breeding for resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 56–64. APS Press, St. Paul, MN.

Fraser, R.S.S. and Gerwitz, A. (1985). A new physical assay method for tobacco mosaic virus using a radioactive virus recovery standard and the first derivative of the ultraviolet absorption spectrum. *J. Virol. Methods* **11**, 289–298.

Fraser, R.S.S. and Whenham, R.J. (1982). Plant growth regulators and virus infection: a critical review. *Plant Growth Regul.* **1**, 37–59.

Fraser, R.S.S. and Whenham, R.J. (1989). Abscisic acid metabolism in tomato plants infected with tobacco mosaic virus: relationships with growth, symptoms, and the Tm-1 gene for TMV resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**, 215–226.

Fraser, R.S.S., Loughlin, S.A.R. and Connor, J.C. (1980). Resistance to tobacco mosaic virus in tomato: effects of the *Tm-1* gene on symptom formation and multiplication of virus strain 1. *J. Gen. Virol.* **50**, 221–224.

Fraser, R.S.S., Gerwitz, A. and Morris, G.E.L. (1986). Multiple regression analysis of the relationships between tobacco mosaic virus multiplication, the severity of mosaic symptoms, and the growth of tobacco and tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **29**, 239–249.

Frazier, N.W., Voth, V. and Bringhurst, R.S. (1965). Inactivation of two strawberry viruses in plants grown in a natural high temperature environment. *Phytopathology* **53**, 1203–1205.

French, C.J. and Elder, M. (1999). Virus particles in guttate and xylem of infected cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Ann. Appl. Biol.* **134**, 81–87.

French, C.J., Elder, M. and Skelton, F. (1993). Recovering and identifying infectious plant viruses in guttation fluid. *HortSci.* **28**, 746–747.

French, R. and Ahlquist, P. (1988). Characterisation and engineering of sequences controlling *in vivo* synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA. *J. Virol.* **62**, 2411–2420.

French, R., Janda, M. and Ahlquist, P. (1986). Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: efficient expression in monocotyledonous plant cells. *Science* **231**, 1294–1297.

Frenkel, M.J., Ward, C.W. and Shukla, D.D. (1989). The use of 3′-noncoding nucleotide sequences in the taxonomy of potyviruses: application to watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus N. *J. Gen. Virol.* **70**, 2775–2783.

Frenkel, M.J., Jilka, J., McKern, N.M. *et al.* (1991). Unexpected sequence diversity in the amino-terminal ends of the coat proteins of strains of sugarcane mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **72**, 237–242.

Freudenrich, A and Nick, P. (1998). Microtubule organization in tobacco cells: heat-shock protein 90 can bind to tubulin *in vitro*. *Bot Acta* **111**, 273–279.

Fribourg, C.E., Jones, R.A.C. and Koenig, R. (1977). Andean potato mottle, a new member of the cowpea mosaic virus group. *Phytopathology* **67**, 969–974.

Fridlund, P.R. (1967a). Effect of time and temperature on the rate of graft transmission of the *Prunus* ringspot virus. *Phytopathology* **57**, 230–231.

Fridlund, P.R. (1967b). The relationship of inoculum–receptor contact period to the rate of graft transmission of twelve *Prunus* viruses. *Phytopathology* **57**, 1296–1299.

Frischmuth, S., Frischmuth, T., Latham, J.R. and Stanley, J. (1993). Transcriptional analysis of the virion-sense genes of the geminivirus beet curly top virus. *Virology* **197**, 312–319.

Frischmuth, T. and Stanley, J. (1991). African cassava mosaic virus DI DNA interferes with the replication of both genomic components. *Virology* **183**, 539–544.

Frischmuth, T. and Stanley, J. (1993). Strategies for the control of geminivirus diseases. *Semin. Virol.* **4**, 329–337.

Frischmuth, T. and Stanley, J. (1998). Recombination between viral DNA and the transgenic coat protein gene of African cassava mosaic geminivirus. *J. Gen. Virol.* **79**, 1265–1271.

Frison, E.A. and Ng, S.Y. (1981). Elimination of sweet potato virus disease agents by meristem tip culture. *Trop. Pest Manag.* **27**, 452–454.

Fritsch, C. and Dollett, M. (2000). Genus *Pecluvirus*. In: M.H.V. van Regenmortel *et al.* (eds) *Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, pp. 913–917. Academic Press, San Diego.

Fritsch, C., Mayo, M.A. and Hirth, L. (1977). Rirther studies on the translation products of tobacco rattle virus RNA *in vitro*. *Virology* **77**, 722–732.

Fritsch, C., Mayo, M.A. and Murant, A.F. (1978). Translation of the satellite RNA of tomato black ring virus *in vitro* and in tobacco protoplasts. *J. Gen. Virol.* **40**, 587–593.

Fritsch, C., Mayo, M.A. and Murant, A.F. (1980). Translation products of genome and satellite RNAs of tomato black ring virus. *J. Gen. Virol.* **46**, 381–389.

Frosheiser, F.I. (1969). Variable influence of alfalfa mosaic virus strains on growth and survival of alfalfa and on mechanical and aphid transmission. *Phytopathology* **59**, 857–862.

Frosheiser, F.I. (1974). Alfalfa mosaic virus transmission to seed through alfalfa gametes and longevity in alfalfa seed. *Phytopathology* **64**, 102–105.

Frost, E.H.E. (1977). Radioactive labelling of viruses: An iodination technique preserving biological properties. *J. Gen. Virol.* **35**, 181–185.

Frost, R.R., Harrison, B.D. and Woods, R.D. (1967). Apparent symbiotic interaction between particles of tobacco rattle virus. *J. Gen. Virol.* **1**, 57–70.

Fry, P.R. and Matthews, R.E.F. (1963). Timing of some early events following inoculation with tobacco mosaic virus. *Virology* **19**, 461–469.

Fry, P.R. and Taylor, W.B. (1954). Analysis of virus local lesion experiments. *Ann. Appl. Biol.* **41**, 664–674.

Fuchs, M., Tricoli, D.M., Carney, K.J., Schesser, M., McPherson, J.R. and Gonsalves, D. (1998). Comparative virus resistance and fruit yield of transgenic squash with single and multiple coat protein genes. *Plant Dis.* **82**, 1350–1356.

Fudl-Allah, A.E.A., Calavan, E.C. and Desjardins, P.R. (1971). Comparative anatomy of healthy and exocortis virus-infected citron plants. *Phytopathology* **61**, 990–993.

Fuentes, A.L. and Hamilton, R.I. (1991). Sunn-hemp mosaic virus facilitates cell-to-cell spread of southern bean mosaic virus in a nonpermissive host. *Phytopathology* **81**, 1302–1305.

Fuentes, A.L. and Hamilton, R.I. (1993). Failure of long-distance movement of southern bean mosaic virus in a resistant host is correlated with lack of normal virion formation. *J. Gen. Virol.* **74**, 1903–1910.

Fujisawa, I., Hayashi, T. and Matsui, C. (1967). Electron microscopy of mixed infections with two plant viruses: I. Intracellular interactions between tobacco mosaic virus and tobacco etch virus. *Virology* **33**, 70–76.

Fujiwara, T., Giesman_Cookmeyer, D., Ding, B., Lommel, S.A. and Lucas, W.J. (1993). Cell-to-cell trafficking of macromolecules through plasmodesmata potentiated by red clover necrotic mosaic virus movement protein. *Plant Cell* **5**, 1783–1794.

Fukuda, M. and Okada, Y. (1985). Elongation in the major direction of tobacco mosaic virus assembly. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **82**, 3631–3634.

Fukuda, M. and Okada, Y. (1987). Bidirectional assembly of tobacco mosaic virus *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 4035–4038.

Fukuda, M., Ohno, T., Okada, Y., Otsuki, Y. and Takebe, I. (1978). Kinetics of biphasic reconstitution of tobacco mosaic virus *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **75**, 1727–1730.

Fukumoto, F. and Tochihara, H. (1984). Effect of various additives on the long-term preservation of tobacco ringspot and radish mosaic viruses. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* **50**, 158–165.

Fukushi, T. (1940). Further studies on the dwarf disease of rice plant. *J. Fac. Agric., Hokkaido Univ.* **45**, 83–154.

Fukushi, T. (1969). Relationships between propagative rice viruses and their vectors. In: K. Maramorosch (ed.) *Viruses, Vectors, and Vegetation*, pp. 279–301. Wiley, New York and London.

Fukuyama, K., Abdel-Meguid, S.S., Johnson, J.E. and Rossmann, M.G. (1983). Structure of a $T = 1$ aggregate of alfalfa mosaic virus coat protein seen at 4.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **167**, 873–894.

Fuller, S.D., Butcher, S.J., Cheng, R.H. and Baker, T.S. (1996). Three-dimensional reconstruction of icosahedral particles: the uncommon line. *J. Struct. Biol.* **116**, 48–55.

Fulton, J.P. (1969). Transmission of tobacco ringspot virus to the roots of a conifer by a nematode. *Phytopathology* **59**, 236.

Fulton, J.P., Gergerich, R.C. and Scott, H.A. (1987). Beetle transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**, 111–123.

Fulton, R.W. (1952). Mutation in a tobacco necrosis virus strain. *Phytopathology* **42**, 156–158.

Fulton, R.W. (1962). The effect of dilution on necrotic ringspot virus infectivity and the enhancement of infectivity by noninfective virus. *Virology* **18**, 477–485.

Fulton, R.W. (1964). Transmission of plant viruses by grafting, dodder, seed and mechanical inoculation. In: M.K. Corbett and H.D. Sisler (eds) *Plant Virology*, pp. 39–67. University of Florida Press, Gainesville, FL.

Fulton, R.W. (1975). The role of top particles in recombination of some characters of tobacco streak virus. *Virology* **67**, 188–196.

Fulton, R.W. (1978). Superinfection by strains of tobacco streak virus. *Virology* **85**, 1–8.

Fulton, R.W. (1980). Biological significance of multicomponent viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**, 131–146.

Fulton, R.W. (1986). Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**, 67–81.

Furuichi, Y. and Shatkin, A.J. (2000). Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. *Adv. Virus Res.* **55**, 135–184.

Furumoto, W.A and Mickey, R. (1967). A mathematical model for the infectivity–dilution curve of tobacco mosaic virus: experimental tests. *Virology* **32**, 224–233.

Furumoto, W.A. and Wildman, S.G. (1963a). Studies on the mode of attachment of tobacco mosaic virus. *Virology* **20**, 45–52.

Furumoto, W.A. and Wildman, S.G. (1963b). The specific infectivity of tobacco mosaic virus. *Virology* **20**, 53–61.

Fütterer, J. and Hohn, T. (1987). Involvement of nucleocapsids in reverse transcription: A general phenomenon? *Trends Biochem. Res.* **12**, 92–95.

Fütterer, J. and Hohn, T. (1991). Translation of a polycistronic mRNA in the presence of the cauliflower mosaic virus transactivator protein. *EMBO J.* **10**, 3887–3896.

Fütterer, J. and Hohn, T. (1992). Role of an upstream open reading frame in the translation of polycistronic mRNAs in plant cells. *Nucl. Acids Res.* **20**, 3851–3857.

Fütterer, J. and Hohn, T. (1996). Translation in plants: rules and exceptions. *Plant Mol. Biol.* **32**, 159–189.

Fütterer, J., Bonneville, J.M. and Hohn, T. (1990). Cauliflower mosaic virus as a gene expression vector for plants. *Physiol. Plantar.* **79**, 154–157.

Fütterer, J., Kiss-László, Z. and Hohn, T. (1993) Nonlinear ribosome migration on cauliflower mosaic virus 35S RNA. *Cell* **73**, 789–802.

Fütterer, J., Potrykus, I., Brau, M.P.V., Dasgupta, I., Hull, R. and Hohn, T. (1994). Splicing in a pararetrovirus. *Virology* **198**, 663–670.

Fütterer, J. Potrykus, I., Bao, Y. *et al.* (1996). Position-dependent ATT initiation during plant pararetrovirus rice tungro bacilliform virus translation. *J. Virol.* **70**, 2999–3010.

Gáborjányi, R., Balázs, E. and Király, Z. (1971). Ethylene production, tissue senescence and local virus infections. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **6**, 51–55.

Gaddipati, J.P. and Siegel, A. (1990). Study of TMV assembly with heterologous RNA containing the origin-of-assembly sequence. *Virology* **174**, 337–344.

Gaddipati, J.P., Atreya, C.D., Rochon, D'A. and Seigel, A. (1988). Characterisation of the TMV encapsidation initiation site on 18S rRNA. *Nucl. Acids Res.* **16**, 7303–7313.

Gadh, I.P.S. and Hari, V. (1986). Association of tobacco etch virus related RNA with chloroplasts in extracts of infected plants. *Virology* **150**, 304–307.

Gaedigk, K., Adam, G. and Mundry, K.-W. (1986). The spike protein of potato yellow dwarf virus and its functional role in the infection of insect vector cells. *J. Gen. Virol.* **67**, 2763–2773.

Gafney, R., Lapidot, M., Berna, A., Holt, C.A., Deom, C.M. and Beachy, R.N. (1992). Effects of terminal deletion mutants on function of the movement protein of tobacco mosaic virus. *Virology* **187**, 499–507.

Gairdner, A.E. (1936). The inheritance of factors in *Cheiranthus cheiri*. *J. Genet.* **32**, 479–486.

Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L. and Ritzenthaler, C. (1999). Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* **264**, 25–36.

Gal, S., Pisan, B., Hohn, T., Grimsley, N. and Hohn, B. (1991). Genomic homologous recombination *in planta*. *EMBO J.* **10**, 1571–1578.

Gal, S., Pisan, B., Hohn, T., Grimsley, N. and Hohn, B. (1992). Agroinfection of transgenic plants leads to viable cauliflower mosaic virus by intermolecular recombination. *Virology* **197**, 525–533.

Gallagher, W.H. and Lauffer, M.A. (1983). Calcium ion binding by tobacco mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **170**, 905–919.

Gallie, D.R. (1996). Translational control of cellular and viral mRNAs. *Plant Mol. Biol.* **32**, 145–158.

Gallie, D.R. (1998). A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* 216, 1–11.

Gallie, D.R. and Kado, C.I. (1989). A translational enhancer derived from tobacco mosaic virus is functionally equivalent to a Shine–Dalgarno sequence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 129–132.

Gallie, D.R. and Walbot, V. (1992). Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucl. Acids Res.* **20**, 4631–4638.

Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts, J.W., Turner, P.C. and Wilson, T.M.A. (1987a). The 5' leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3257–3273.

Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts, J.W., Turner, P.C. and Wilson, T.M.A. (1987b). A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* **15**, 8693–8711.

Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts, J.W., Turner, P.C. and Wilson, T.M.A. (1987c). *In vivo* uncoating and efficient expression of foreign mRNAs packaged in TMV-like particles. *Science* **236**, 1122–1124.

Gallie, D.R., Plaskitt, K.A. and Wilson, T.M.A. (1987d). The effect of multiple dispersed copies of the origin-of-assembly sequence from TMV RNA on the morphology of pseudovirus particles assembled *in vitro*. *Virology* **158**, 473–476.

Gallie, D.R., Walbot, V. and Hershey, J.W.B. (1988). The ribosomal fraction mediates the translational enhancement associated with the 5'-leader of tobacco mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* **16**, 8675–8694.

Gallie, D.R., Tanguay, R. and Leathers, V. (1995). The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Gene* **165**, 233–238.

Gallitelli, D. and Hull, R. (1985). Characterisation of satellite RNAs associated with tomato bushy stunt virus and five other definitive tombusviruses. *J. Gen. Virol.* **66**, 1533–1543.

Gallitelli, D., Vovlas, C., Martelli, G., Montasser, M.S., Tousignant, M.E. and Kaper, J.M. (1991). Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: II. Field test under natural epidemic conditions in southern Italy. *Plant Dis.* **75**, 93–95.

Gal-On, A., Kaplan, I., Roossinck, M.J. and Palukaitis, P. (1994). The kinetics of infection of zucchini squash by cucumber mosaic virus indicate a function for RNA-1 in virus movement. *Virology* **205**, 280–289.

Gal-On, A., Meiri, E., Huet, H., Hua, W.J., Raccah, B. and Gaba, V. (1995). Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of zucchini yellow mosaic potyvirus. *J. Gen Virol.* **76**, 3223–3227.

Gal-On, A., Meiri, E., Elman, C., Gray, D.J and Gaba, V. (1997). Simple hand-held devices for the efficient infection of plants with viral-encoding constructs by particle bombardment. *J. Virol. Methods* **64**, 103–110.

Gal-On, A., Canto, T. and Palukaitis, P. (2000). Characterisation of genetically modified cucumber mosaic virus expressing histidine-tagged 1a and 2a proteins. *Archiv. Virol.* **145**, 37–50.

Gamez, R. and Léon, P. (1988). Maize raydo fino and related viruses. In: R. Koenig (ed.) *The Plant Viruses*, Vol. 3, pp. 213–233. Plenum, New York.

Gao, C., Mao, S., Lo, C.-H., Wirsching, P., Lerner, R.A. and Janda, K.D. (1999). Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 6025–6030.

García, J.A., Schrijvers, L., Tan, A., Vos, P., Wellink, J. and Goldbach, R. (1987). Proteolytic activity of the cowpea mosaic virus encoded 24K protein synthesised in *Escherichia coli*. *Virology* **159**, 67–75.

García, J.A., Cervera, M.T., Reichmann, J.L. and López-Otin, C. (1993). Inhibitory effects of human cyctetin C. on plum pox potyvirus proteases. *Plant Mol. Biol.* **22**, 697–701.

García-Arenal, F. (1988). Sequence and structure at the genome 3'-end of the U2 strain of tobacco mosaic virus, a histidine accepting tobamovirus. *Virology* **167**, 201–206.

García-Arenal, F. and Palukaitis, P. (1999). Structure and functional relationships of satellite RNAs of cucumber mosaic virus. In: P.K. Vogt and A.O. Jackson (eds) *Satellites and Defective RNAs*, pp. 37–63. Springer, Berlin.

García-Arenal, F., Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1984). Strains and mutants of tobacco mosaic virus are both found in virus derived from single-lesion-passaged inoculum. *Virology* **132**, 131–137.

García-Luque, I., Kaper, J.M., Diaz-Ruiz, J.R. and Rubio-Huertos, M. (1984). Emergence and characterization of satellite RNAs associated with Spanish cucumber mosaic virus isolates. *J. Gen. Virol.* **65**, 539–547.

Gardiner, W.E., Sunter, G., Brand, L., Elmer, J.S., Rogers, S.G. and Bisaro, D.M. (1988). Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *EMBO J.* **7**, 899–904.

Gargouri, R., Joshi, R.L., Bol, J.F., Astier-Manifaçier, S. and Haenni, A.-L. (1989). Mechanism of synthesis of turnip yellow mosaic virus coat protein subgenomic RNA *in vivo*. *Virology* **171**, 386–393.

Garnier, M., Mamoun, R. and Bové, J.M. (1980). TYMV RNA replication *in vivo*: Replicative intermediate is mainly single stranded. *Virology* **104**, 357–374.

Garnier, M., Candresse, T. and Bové, J.M. (1986). Immunocytochemical localization of TYMV coded structural and non-structural proteins by the protein A-gold technique. *Virology* **151**, 100–109.

Garnsey, S.M. and Randles, J.W. (1987). Biological interactions and agricultural implications of viroids. In: J.S. Semancik (ed.) *Viroids and Viroid-Like Pathogens*, pp. 127–160. CRC Press, Boca Raton, FL.

Garnsey, S.M. and Whidden, R. (1973). Efficiency of mechanical inoculation procedures for citrus exocortis virus. *Plant Dis. Rep.* **57**, 886–889

Garnsey, S.M., Gonsalves, D. and Purcifull, D.E. (1977). Mechanical transmission of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **67**, 965–968.

Garnsey, S.M., Gottwald, T.R. and Yokomi, R.K. (1998). Control strategies for citrus tristeza virus. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 639–658. APS Press, St. Paul, MN.

Garrett, R.G. and O'Loughlin, G.T. (1977). Broccoli necrotic yellows virus in cauliflower and in the aphid *Brevicoryne brassicae* L. *Virology* **76**, 653–663.

Garrido-Ramirez, E.R., Sudarshana, M.R., Lucas, W.J. and Gilbertson, R.L. (2000). Bean dwarf mosaic virus BV1 protein is a determinant of the hypersensitive response and avirulence in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant Microb. Interact.* **13**, 1184–1194.

Garzon-Tiznado, J.A., Torres-Pacheco, I., Ascencio-Ibanez, J.T., Herrera-Estrella, L. and Rivera-Bustamante, R.F. (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new gemini-virus by a biolistic procedure. *Phytopathology* **83**, 514–521.

Gast, F.U., Kempe, D., Spieker, R.L. and Sänger, H.L. (1996). Secondary structure probing of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and sequence comparison with other small pathogenic RNA replicons provides evidence central non-canonical base-pairs, large A-rich loops and a terminal branch. *J. Mol. Biol.* **263**, 652–670.

Gaut, B.S., d'Ennequin, M. Le T., Peek, A.S. and Sawkins, M.C. (2000). Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 7008–7015.

Gay, J.D., Johnson, A.W. and Chalfant, R.B. (1973). Effects of a trapcrop on the introduction and distribution of cowpea virus by soil and insect vectors. *Plant Dis. Rep.* **57**, 684–688.

Ge, X., Scott, S.W. and Zimmerman, M.T. (1997). The complete sequence of the genomic RNAs of spinach latent virus. *Archiv. Virol.* **142**, 1213–1226.

Gebre Selassie, K., Marchoux, G., Delecolle, B. and Pochard, E. (1985). Varabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans le cultures du piment du sud-est de la France: caractérisation et classification en pathotypes. *Agronomie* **5**, 621–630.

Geelen, J.L.M.C., van Kammen, A. and Verduin, B.J.M. (1972). Structure of the capsid of cowpea mosaic virus. The chemical subunit: molecular weight and number of subunits per particle. *Virology* **49**, 205–213.

Geldreich, A., Lebeurier, G. and Hirth, L. (1986). *In vivo* dimerisation of cauliflower mosaic virus DNA can explain recombination. *Gene* **48**, 277–286.

Georghiou, G.P. and Saito, T. (eds) (1983). *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum, New York.

Gera, A. and Loebenstein, G. (1988). An inhibitor of virus replication associated with green island tissue of tobacco infected with cucumber mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **32**, 373–385.

Gera, A. Loebenstein, G. and Raccah, B. (1979). Protein coats of two strains of cucumber mosaic virus affect transmission by *Aphis gossypii*. *Phytopathology* **69**, 396–399.

Gera, A., Loebenstein, G., Salomon, R. and Frank, A. (1990). An inhibitor of virus replication (IVR) from protoplasts of a hypersensitive tobacco cultivar infected with tobacco mosaic virus is associated with a 23 K protein species. *Phytopathology* **80**, 78–81.

Gera, A., Deom, C.M., Shaw, J.J., Lewandowski, D.J. and Dawson, W.O. (1995). Tobacco mosaic tobamovirus does not require concomitant synthesis of movement protein during vascular transport. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **8**, 784–787.

Gergerich, R.C. and Scott, H.A. (1988a). The enzymatic function of ribonuclease determines plant virus transmission by leaf-feeding beetles. *Phytopathology* **78**, 270–272.

Gergerich, R.C. and Scott, H.A. (1988b). Evidence that virus translation and virus infection of nonwounded cells are associated by transmissibility by leaf-feeding beetles. *J. Gen. Virol.* **69**, 2935–2938.

Gergerich, R.C., Scott, H.A. and Fulton, J.P. (1983). Regurgitant as a determinant of specificity in the transmission of plant viruses by beetles. *Phytopathology* **73**, 936–938.

Gergerich, R.C., Scott, H.A. and Fulton, J.P. (1986). Evidence that ribonuclease in beetle regurgitant determines the transmission of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **67**, 367–370.

Geri, C., Cecchini, E., Giannakou, M.E., Covey, S.N. and Milner, J.J. (1999). Altered patterns of gene expression in *Arabidopsis* elicited by cauliflower mosaic virus (CaMV) infection and by a CaMV gene VI transgene. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **12**, 377–384.

Gerlach, W.L., Llewellyn, D and Haseloff, J. (1987). Construction of a plant resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Nature (Lond.)* **328**, 802–805.

German-Retana, S. and Candresse, T. (1999). Trichoviruses. . In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1837–1842. Academic Press, San Diego.

German-Retana, S., Candresse, T. and Martelli, G. (1999). Closteroviruses (*Closteroviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 266–273. Academic Press, San Diego.

Gerpa, C.P. (1984). Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv. Appl. Microbiol.* **30**, 133–168.

Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. (1996). RECODING: dynamic reprogramming of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 741–768.

Geysen, H.M., Meloen, R.H. and Barteling, S.J. (1984). Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3998–4002.

Ghabrial, S.A. and Hillman, B.I. (1999). Partitiviruses—fungal (*Partitiviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1147–1151. Academic Press, San Diego.

Ghabrial, S.A. and Lister, R.M (1973). Anomalies in molecular weight determinations of tobacco rattle virus protein by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis. *Virology* **51**, 485–488.

Ghabrial, S.A. and Patterson, J.L. (1999). Totiviruses (*Totiviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1808–1812.. Academic Press, San Diego.

Ghabrial, S.A. and Shepherd, R.J. (1980). A sensitive radioimmunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **48**, 311–317.

Ghanim, M. and Czosnek, H. (2000). Tomato yellow leafcurl geminivirus (TYLCV-Is) is transmitted among whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related manner. *J. Virol.* **74**, 4738–4745.

Gharbi, S. and Verhoyen, M. (1993). Sterilisation par irradiation UV des solutions nutritives en vue d'eviter les infections virales propagees par *O. brassicae* en culture hydroponique de laitue. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* **53/3a**, 1113–1124.

Ghorbel, R., López, C., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R. and Peña, L. (2001). Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molec. Plant Pathol.* **2**, 27–36.

Ghosh, A., Rutgers, T., Ke-Qiang, M. and Kaesberg, P. (1981). Characterisation of the coat protein mRNA of Southern bean mosaic virus and its relationship to the genomic RNA. *J. Virol.* **39**, 87–92.

Ghoshroy, S., Lartey, R., Sheng, J. and Citovsky, V. (1997). Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 27–50.

Gianinazzi, S., Martin, C. and Vallée, J.-C. (1970). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana* Xanthi n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D* **270**, 2383–2386.

Gianinazzi, S., Deshayes, A., Martin, C. and Vernoy, R. (1977). Differential reactions to tobacco mosaic virus infection in Samsun 'nn' tobacco plants: I. Necrosis, mosaic symptoms and symptomless leaves following the ontogenic gradient. *Phytopathol. Z.* **88**, 347–354.

Giband, M., Mensard, J.M. and Lebeurier, G. (1986). The gene III product (P15) of cauliflower mosaic virus is a DNA-binding protein while an immunologically related P11 polypeptide is associated with virions. *EMBO J.* **5**, 2433–2438.

Gibb, K.S. and Randles, J.W. (1988). Studies on the transmission of velvet tobacco mottle virus by the mirid *Cyrtopeltis nicotianae*. *Ann. Appl. Biol.* **112**, 427–437.

Gibb, K.S. and Randles, J.W. (1990). Distribution of velvet tobacco mottle virus in its mired vector and its relationship to transmissibility. *Ann. Appl. Biol.* **116**, 513–521.

Gibbs, A. (1976) Viruses and plasmodesmata. In: B.E.S. Gunning and R.W. Robards (eds) *Intercellular Communication in Plants: Studies on Plasmodesmata*, pp. 149–164. Springer-Verlag, Berlin.

Gibbs, A. (1986). Tobamovirus classification. In: M.H.V. van Regenmortel and H. Fraenkel-Conrat (eds) *The Plant Viruses*, Vol. 2, pp. 167–180. Plenum, New York.

Gibbs, A. (1999a). Tymoviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1859–1853. Academic Press, San Diego.

Gibbs, A.J. (1962). Lucerne mosaic virus in British lucerne crops. *Plant Pathol.* **11**, 167–171.

Gibbs, A.J. (1969). Plant virus classification. *Adv. Virus Res.* **14**, 263–328.

Gibbs, A.J. (1999a). Evolution and origins of tobamoviruses. *Phil Trans. R. Soc. Lond. B* **354**, 593–602.

Gibbs, A.J. and Harrison, B. (1976). *Plant Virology: The Principles*. Edward Arnold, London.

Gibbs, A.J. and Keese, P.K. (1995). In search of the origins of viral genes. In: A.J. Gibbs, C.H. Calisher and F. Garcia-Arenal (eds) *Molecular Basis for Virus Evolution*, pp. 76–90. Cambridge University Press, Cambridge.

Gibbs, A.J. and McIntyre, G.A. (1970). A method for assessing the size of a protein from its composition: its use in evaluating data on the size of the protein subunits of plant virus particles. *J. Gen. Virol.* **9**, 51–67.

Gibbs, A.J. and McIntyre, G.A. (1971). The diagram, a method for comparing sequences. *Eur. J. Biochem.* **16**, 1–11.

Gibbs, A.J. and Tinsley, T.W. (1961). Lucerne mosaic virus in Great Britain. *Plant Pathol.* **10**, 61–62.

Gibbs, A.J., Harrison, B.D., Watson, D.H. and Wildy, P. (1966). What's in a virus name? *Nature (London)* **209**, 450–454.

Gibbs, A.J., Keese, P.L., Gibbs, M.J. and Garcia-Arenal, F. (1999). Plant virus evolution: past, present and future. In: E. Domingo, R. Webster and J. Holland (eds) *Origin and evolution of viruses*, pp. 263–285. Academic Press, London.

Gibbs, M. (1995). The luteovirus supergroup: rampant recombination and persistent partnerships. In: A.J. Gibbs, C.H. Calisher and F. Garcia-Arenal (eds) *Molecular Basis for Virus Evolution*, pp. 351–368. Cambridge University Press, Cambridge.

Gibbs, M.J. and Cooper, J.I. (1995). A recombinational event in the history of luteoviruses probably induced by base-pairing between the genomes of two distinct viruses. *Virology* **206**, 1129–1132.

Gibbs, M.J. and Weiller, G.F. (1999). Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8022–8027.

Gibbs, M.J., Cooper, J.I. and Waterhouse, P.M. (1996). The genome organization and affinities of an Australian isolate of carrot mottle umbravirus. *Virology* **224**, 310–313.

Gibbs, M.J., Koga, R., Moriyama, H., Pfeiffer, P. and Fukuhara, T. (2000). Phylogenetic analysis of some large double-stranded RNA replicons from plants suggests they evolved from a defective single-stranded virus. *J. Gen. Virol.* **81**, 227–233.

Gibbs, P.E.M., Witke, W.F. and Dugaiczyk, A. (1998). The molecular clock runs at different rates among closely related members of a gene family. *J. Mol. Evol.* **46**, 552–561.

Gibson, R.W. and Rice, A.D. (1986). The combined use of mineral oils and pyrethroids to control plant viruses transmitted non- and semi-persistently by *Myzus persicae*. *Ann. Appl. Biol.* **109**, 465–472.

Gibson, R.W., Pickett, J.A., Dawson, G.W., Rice, A.D. and Stribley, M.F. (1984). Effects of aphid alarm pheromone derivatives and related compounds on non- and semi-persistent plant virus transmission by *Myzus persicae*. *Ann. Appl. Biol.* **104**, 203–209.

Gibson, R.W., Payne, R.W. and Katis, N. (1988). The transmission of potato virus Y by aphids of differing vectoring abilities. *Ann. Appl. Biol.* **113**, 35–43.

Giedroc, D.P., Theimer, C.A. and Nixon, P.L. (2000). Structure, stability and function of RNA pseudoknots involved in stimulating ribosomal frameshifting. *J. Mol. Biol.* **298**, 167–185.

Gierer, A. (1957). Structure and biological function of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. *Nature (London)* **179**, 1297–1299.

Gierer, A. (1958). Die Gross der biologisch aktiven Einheit der Ribosenucleinsdure des Tabakmosaikvirus. *Z. Naturforsch. B: Anorg. Chem., Org. Chem. Biochem., Biophys., Biol.* **13**, 485–488.

Gierer, A. and Mundry, K.W. (1958). Production of mutants of tobacco mosaic virus by chemical alteration of its ribonucleic acid *in vitro*. *Nature (Lond.)* **182**, 1457–1458.

Gierer, A. and Schramm, G. (1956). Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. *Nature (London)* **177**, 702–703.

Giesman-Cookmeyer, D. and Lommel, S.A. (1993). Alanine scanning mutagenesis of a plant virus movement protein identifies three functional domains. *Plant Cell* **5**, 973–982.

Giesman-Cookmeyer, D., Silver, S., Vaewhongs, A., Lommel, S.A. and Deom, C.M. (1995). Tobamovirus and dianthovirus movement proteins are functionally homologous. *Virology* **213**, 38–46.

Gilbert, J., Spillane, C., Kavanagh, T.A. and Baulcombe, D.C. (1998). Elicitation of *Rx*-mediated resistance to PVX in potato does not require new RNA synthesis and may involve a latent hypersensitive response. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 833–835.

Gilbertson, R.L., Faria, J.C., Hanson, S.F. *et al.* (1991). Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. *Phytopathology* **81**, 980–985.

Gilchrist, D.G. (1998). Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 393–414.

Gildow, F.E. (1982). Coated-vesicle transport of luteoviruses through salivary glands of *Myzus persicae*. *Phytopathology* **72**, 1289–1296.

Gildow, F.E. (1983). Influence of barley yellow dwarf virus-infected oats and barley on morphology of aphid vectors. *Phytopathology* **73**, 1196–1199.

Gildow, F.E. (1985). Transcellular transport of barley yellow dwarf virus into the hemocoel of the aphid vector, *Rhopalosiphum padi*. *Phytopathology* **75**, 292–297.

Gildow, F.E. (1987). Virus–membrane interactions involved in circulative transmission of luteoviruses by aphids. *Curr. Top. Vector Res.* **4**, 93–120.

Gildow, F.E. (1999). Luteovirus transmission and mechanisms regulating vector specificity. In: H.G. Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp.88–112. CAB International, Wallingford, UK.

Gildow, F.E. and D'Arcy, C.J. (1988). Barley and oats as reservoirs for an aphid virus and the influence on barley yellow dwarf transmission. *Phytopathology* **78**, 811–816.

Gil-Fernandez, C. and Black, L.M. (1965). Some aspects of the internal anatomy of the leafhopper *Agallia constricta* (Homoptera: Cicadellidae). *Ann. Ent. Soc. Am.* **58**, 275–284.

Gill, C.C. (1970). Aphid nymphs transmit an isolate of barley yellow dwarf virus more efficiently than do adults. *Phytopathology* **60**, 1747–1752.

Gill, C.C. (1974). Inclusions and wall deposits in cells of plants infected with oat necrotic mottle virus. *Can. J. Bot.* **52**, 621–626.

Gill, C.C. and Chong, J. (1979). Cytological alterations in cells infected with corn leaf aphid-specific isolates of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology* **69**, 363–368.

Gill, C.C. and Chong, J. (1981). Vascular cell alterations and predisposed xylem infection in oats by inoculations with paired barkey yellow dwarf viruses. *Virology* **114**, 405–414.

Gill, R.J. (1990). The morphology of whiteflies. In: D. Gerling (ed.) *Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management*, pp. 13–46. Intercept, Andover, UK.

Gillaspie, A.G. and Bancroft, J.B. (1965). The rate of accumulation, specific infectivity and electrophoretic characteristics of bean pod mottle virus in bean and soybean. *Phytopathology* **55**, 906–908.

Gilmer, R.M. (1965). Additional evidence of tree-to-tree transmission of sour cherry yellows virus by pollen. *Phytopathology* **55**, 482–483.

Gilmer, R.M. and Brase, K.D. (1963). Nonuniform distribution of prune dwarf virus in sweet and sour cherry trees. *Phytopathology* **53**, 819–821.

Gilmer, R.M., Uyemoto, J.K. and Kelts, L.J. (1970). A new grapevine disease induced by tobacco ringspot virus. *Phytopathology* **60**, 619–627.

Gingery, R.E. and Louie, R. (1985). A satellite-like virus particle associated with maize white line mosaic virus. *Phytopathology* **75**, 870–874.

Givord, L., Xiong, C., Giband, M. *et al.* (1984). A second cauliflower mosaic virus gene product influences the structure of the viral inclusion body. *EMBO J.* **3**, 1423–1427.

Givord, L., Dixon, L., Rauseo-Koenig, I. and Hohn, T. (1988). Cauliflower mosaic virus ORF VII is not required for aphid transmissibility. *Ann. Inst. Pasteur Virol.* **139**, 227–231.

Glais, L., Tribodet, M., Gauthier, J.P., Astier-Manifacier, S., Robaglia, C. and Kerlan, C. (1998). RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of potato virus Y. *Arch. Virol.* **143**, 2077–2091.

Glover, J.F. and Wilson, T.M.A. (1982). Efficient translation of the coat protein cistron of tobacco mosaic virus in a cell free system from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **122**, 485–492.

Godchaux, W. and Schuster, T.M. (1987). Isolation and characterisation of nucleoprotein assembly intermediates of tobacco mosaic virus. *Biochemistry* **26**, 454–461.

Godefroy-Colburn, T., Gagey, M.-J., Berna, A. and Stussi-Garaud, C. (1986). A non-structural protein of alfalfa mosaic virus in the walls of infected tobacco cells. *J. Gen. Virol.* **67**, 2233–2239.

Goelet, P. and Karn, J. (1982). Tobacco mosaic virus induces the synthesis of a family of 3′ coterminal messenger RNAs and their complements. *J. Mol. Biol.* **154**, 541–550.

Goelet, P., Lomonossoff, G.P., Butler, P.J.G., Akam, M.E., Gait, M.J. and Karn, J. (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 5818–5822.

Goffeau, A. and Bové, J.M. (1965). Virus infection and photosynthesis: I. Increased photophosphorylation by chloroplasts from Chinese cabbage infected with turnip yellow mosaic virus. *Virology* **27**, 243–252.

Gokhale, D.V. and Bald, J.G. (1987). Relationship between plant virus concentration and infectivity: a 'growth curve' model. *J. Virol. Methods* **18**, 225–232.

Goldbach, R. and Krijt, J. (1982). Cowpea mosaic virus-encoded protease does not recognise primary translation products of mRNAs from other comoviruses. *J. Virol.* **43**, 1151–1154.

Goldbach, R. and Rezelman, G. (1983). Orientation of the cleavage map of the 200-kilodalton polypeptide encoded by the bottom-component RNA of cowpea mosaic virus. *J. Virol.* **46**, 614–619.

Goldbach, R. and Wellink, J. (1996). Comoviruses: molecular biology and replication. In: B.D. Harrison and A.F. Murant (eds) *The Plant Viruses. Vol. 5: Polyhedral Virions and Bipartite Genomes*, pp. 35–76. Plenum Press, New York.

Goldbach, R., Rezelman, G. and van Kammen, A. (1980). Independent replication and expression of B-component RNA of cowpea mosaic virus. *Nature (London)* **285**, 297–300.

Goldbach, R., Schilthuis, J.G. and Rezelman, G. (1981). Comparison of *in vivo* and *in vitro* translation of cowpea mosaic virus RNAs. Biochem. *Biophys. Res. Commun.* **99**, 89–94.

Goldberg, K.-B., Kiernan, J. and Shepherd, R.J. (1991). A disease syndrome associated with expression of gene VI of caulimoviruses may be a nonhost reaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* **4**, 182–189.

Goldberg, R.B. (1988). Plants. Novel developmental processes. *Science* **240**, 1460–1467.

Golemboski, D.B., Lomonossoff, G.P. and Zaitlin, M. (1990). Plants transformed with a tobacco mosaic virus non-structural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 6311–6315.

Gonsalves, D. (1998). Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 415–437.

Gonsalves, D. and Fulton, R.W. (1977). Activation of *Prunus* necrotic ringspot virus and rose mosaic virus by RNA4 components of some ilarviruses. *Virology* **81**, 398–407.

Gonsalves, D., Provvidenti, R. and Edwards, M.C. (1982). Tomato white leaf: the relation of an apparent satellite RNA and cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **72**, 1533–1538.

Goodey, T. (1963). *Soil and Freshwater Nematodes*, 2nd rev. ed. Methuen, London.

Gooding, G.V. (1970). Natural serological strains of tobacco ringspot virus. *Phytopathology* **60**, 708–713.

Gooding, G.V. (1975). Inactivation of tobacco mosaic virus on tomato seed with trisodium orthophosphate and sodium hypochlorite. *Plant Dis. Rep.* **59**, 770–772.

Goodman, M., Czelusniak, J., Koop, B.F., Tagle, D.A. and Slightom, J.L. (1987). Globins: a case study in molecular phylogeny. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**, 875–890.

Goodman, R.M. (1977). Single-stranded DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus. *Virology* **83**, 171–179.

Goodman, R.M. (1981). Geminiviruses. In: E. Kurstak (ed.) *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, pp. 883–910. Elsevier, New York.

Goodman, R.M. and Ross, A.F. (1974a). Enhancement of potato virus X synthesis in doubly infected tobacco occurs in doubly infected cells. *Virology* **58**, 16–24.

Goodman, R.M. and Ross, A.F. (1974b). Independent assembly of virions in tobacco doubly infected by potato virus X and Virus Y or tobacco mosaic virus. *Virology* **59**, 314–318.

Goodman, R.M., McDonald, J.G., Horne, R.W. and Bancroft, J.B. (1976). Assembly of flexuous plant viruses and their proteins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **276**, 173–179.

Gorbalenya, A.E. (1995). Origin of RNA viral genomes: approaching the problem by comparative sequence analysis. In: A.J. Gibbs, C.H. Calisher and F. García-Arenal (eds) *Molecular Basis for Virus Evolution*, pp. 49–66. Cambridge University Press, Cambridge.

Gorbalenya, A.E. and Koonin, E.V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 419–429.

Gorbalenya, A.E., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. (1986). A possible common origin of poliovirus proteins with different functions. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* **1**, 36–41.

Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Blinov, V.M. and Donchenko, A.P. (1988). Sobemovirus genome appears to encode a serine protease related to cysteine proteases of picornaviruses. *FEBS Lett.* **236**, 287–290.

Gordon, D.T. (1999). Waikaviruses (*Sequiviridae*). . In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1965–1970. Academic Press, San Diego.

Gordon, K.H.J. and Symons, R.H. (1983). Satellite RNA of cucumber mosaic virus forms a secondary structure with partial 3'-terminal homology to genomal RNAs. *Nucl. Acids Res.* **11**, 947–960.

Gordon, K.H.J., Pfeiffer, P., Fütterer, J. and Hohn, T. (1988). *In vitro* expression of cauliflower mosaic virus genes. *EMBO J.* **7**, 309–317.

Goregaoker, S.P., Eckhardt, L.G. and Culver, J.N. (2000). Tobacco mosaic virus replicase-mediated cross-protection: contributions of RNA and protein-mediated mechanisms. *Virology* **273**, 267–275.

Goregaoker, S.P., Lewandowski, D.J. and Culver, J.N. (2001). Interactions between the 126/183 kDa replicase associated proteins of tobacco mosaic virus. Abstract W42-2, 20th Annual Meeting of the American Society for Virology.

Gough, K.C., Cockburn, W. and Whitelam, G.C. (1999). Selection of phage display peptides that bind to cucumber mosaic virus coat protein. *J. Virol Methods* **79**, 169–180.

Gould, A.R., Palukaitis, P., Symons, R.H. and Mossop, D.W. (1978). Characterization of a satellite RNA associated with cucumber mosaic virus. *Virology* **84**, 443–455.

Govier, D.A. and Woods, R.D. (1971). Changes induced by magnesium ions in the morphology of some plant viruses with filamentous particles. *J. Gen. Virol.* **13**, 127–132

Gowda, S., Wu, F.C., Scholthof, H.B. and Shepherd, R.J. (1989). Gene VI of figwort mosaic virus (caulimovirus group) functions in post transcriptional expression of genes on the full-length RNA transcript. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 9203–9207.

Gowda, S., Satyanarayana, T., Naidu, R.A., Mushegian, A., Dawson, W.O. and Reddy, D.V.R. (1998). Characterization of the large (L) RNA of peanut bud necrosis tospovirus. *Arch. Virol.* **143**, 2381–2390.

Gracía, O. and Shepherd, R.J. (1985). Cauliflower mosaic virus in the nucleus of *Nicotiana*. *Virology* **146**, 141–145.

Graddon, D.J. and Randles, J.W. (1986). Single antibody dot immunoassay—a simple technique for rapid detection of a plant virus. *J. Virol. Methods* **13**, 63–69.

Graham, M.W., Keese, P. and Waterhouse, P.M. (1995). The search for the perfect potato. *Today's Life Sciences* **7**, 34–41.

Granell, A., Belles, J.M. and Conejero, V. (1987). Induction of pathogenesis-related proteins in tomato by citrus exocortis viroid, silver ion, and ethephon. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **31**, 83–90.

Grasmick, M.E. and Slack, S.A. (1986). Effect of potato spindle tuber viroid on sexual reproduction and viroid transmission in true potato seed. *Can. J. Bot.* **64**, 336–340.

Gratia, A. (1933). Pluralité antigénique et identification sérologique des virus de plantes. *CR Seances Soc. Biol. Ses Fil.* **114**, 923.

Graves, M.V. and Roossinck, M.J. (1995a). Characterization of defective RNAs derived from RNA 3 of the Fny strain of cucumber mosaic cucumovirus. *J. Virol* **69**, 4746–4751.

Graves, M.V. and Roossinck, M.J. (1995b). Host specific maintenance of a cucumovirus defective RNA. Presented at the 14th Annual Meeting of the American Society for Virology, University of Texas, Austin, TX.

Graves, M.V., Pogany, J. and Romero, J. (1996). Defective interfering RNAs and defective viruses associated with multipartite RNA viruses of plants. *Sem. Virol.* **7**, 399–408.

Gray, S.M. (1996). Plant virus proteins involved in natural vector transmission. *Trends Microbiol.* **4**, 253–294.

Gray, S.M. and Banerjee, N. (1999). Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 128–148.

Gray, S.M. and Rochon, D.'A. (1999). Vector transmission of plant viruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1899–1910. Academic Press, San Diego.

Greene, A.E. and Allison, R.F. (1994). Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* **263**, 1423–1425.

Gregory, P.H. (1948). The multiple-infection transformation. *Ann. Appl. Biol.* **35**, 412–417.

Gribskov, M. and Devereux, J. (eds) (1991). *Sequence Analysis Primer*. M Stockton Press, New York.

Grieco, F., Martelli, G.P. and Savino, V. (1995). The nucleotide sequence of RNA3 and RNA4 of olive latent virus—2. *J. Gen. Virol.* **76**, 929–937.

Grieco, F., DellOrco, M. and Martelli, G.P. (1996). The nucleotide sequence of RNA1 and RNA2 of olive latent virus -2 and its relationship to the family *Bromoviridae*. *J. Gen. Virol.* **77**, 2637–2644.

Griep, R.A., van Twisk, C. and Schots, A. (1999). Selection of beet necrotic yellow vein virus specific single-chain Fv antibodies from a semi-synthetic combinatorial antibody library. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**, 147–156.

Griep, R.A., Prins, M., van Twisk, C. *et al.* (2000). Application of phage display in selecting tomato spotted wilt virus-specific single-chain antibodies (scFv) for sensitive diagnosis in ELISA. *Phytopathology* **90**, 183–190.

Grill, L.K. and Semancik, J.S. (1978). RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **75**, 896–900.

Grimes, J.M., Kakana, J., Ghosh, M. *et al.* (1997). An atomic model of the outer layer of the bluetongue virus core derived from X-ray crystallography and electron cryo-microscopy. *Structure* **5**, 885–893.

Grimm, M., Nass, A., Schull, C. and Beier, H. (1998). Nucleotide sequences and functional characterization of two tobacco UAG suppressor tRNA(Gln) isoacceptors and their genes. *Plant Mol. Biol.* **38**, 689–697.

Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T. and Walden, R. (1986). 'Agroinfection', an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 3282–3286.

Grimsley, N., Hohn, T., Davies, J.W. and Hohn, B. (1987). *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature (London)* **325**, 177–179.

Grivell, A.R., Grivell, C.J., Jackson, J.F. and Nicholas, D.J.D. (1971). Preservation of lettuce necrotic yellows and some other plant viruses by dehydration with silica gel. *J. Gen. Virol.* **12**, 55–58.

Grogan, R.G. and Bardin, R. (1950). Some aspects concerning the seed transmission of lettuce mosaic virus. *Phytopathology* **40**, 965.

Grogan, R.G., Zink, F.W., Hewitt, W.B. and Kimble, K.A. (1958). The association of *Olpidium* with the big-vein disease of lettuce. *Phytopathology* **48**, 292–297.

Gronenborn, B., Gardner, R.C., Schaefer, S. and Shepherd, R.J. (1981). Propagation of foreign DNA in plants using cauliflower mosaic virus as vector. *Nature (Lond.)* **294**, 773–776.

Gröning, B.R., Abouzid, A. and Jeske, H. (1987). Single-stranded DNA from abutilon mosaic virus is present in the plastids of infected *Abutilon sellovianum*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 8996–9000.

Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H. and Sänger, H.L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature (London)* **273**, 203–208.

Grosset, J., Meyer, I., Chartier, Y., Kauffmann, S., Legrand, M. and Fritig, B. (1990). Tobacco mesophyll protoplasts synthesise 1,3-β-glucanase chitinases and 'Osmotins' during *in vitro* culture. *Plant Physiol.* **92**, 520–527.

Grumet, R., Kabelka, E., McQueen, S., Wai, T. and Humphrey, R. (2000). Characterization of sources of resistance to the watermelon strain of papaya ringspot virus in cucumber: allelism and co-segregation with other potyvirus resistances. *Theor. Appl. Genet.* **101**, 463–472.

Guan, H., Song, C. and Symon, A.E. (1997). RNA promoters located on minus -strands of a subviral RNA associated with turnip crinkle virus. *RNA* **3**, 1401–1412.

Guan, H., Carpenter, C.D. and Simon, A.E. (2000). Requirement of a 5'-proximal linear sequence on minus strands for plus-strand synthesis of a satellite RNA associated with turnip crinkle virus. *Virology* **268**, 355–363.

Gugerli, P. (1976). Different states of aggregation of tobacco rattle vines coat protein. *J. Gen. Virol.* **33**, 297–307.

Gugerli, P. (1977). Untersuchungen über die großräumige und lokale Verbreitung des Tabakrattlevirus (TRV) und seiner Vektoren in der Schweiz. *Phytopathol. Z.* **89**, 1–24.

Gugerli, P. (1984). Isopycnic centrifugation of plant viruses in Nycodenz® density gradients. *J. Virol. Meth.* **9**, 249–258.

Gugerli, P. and Fries, P. (1983). Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. *J. Gen. Virol.* **64**, 2471–2477.

Guilford, P.J. (1989). *A Molecular Analysis of Tobacco Rattle Mosaic Virus RNA1*. PhD thesis, University of Cambridge, UK.

Guilfoyle, T.J., McClure, B.A., Gee, M.A. and Hagen, G. (1993). Tissue-print hybridisation for detecting DNA directly. *Methods Enzymol.* **218**, 688–695.

Guilley, H., Richards, K.E. and Jonard, G. (1983). Observations concerning the discontinuous DNAs of cauliflower mosaic virus. *EMBO J.* **2**, 277–282.

Guilley, H., Carrington, J.C., Balàzs, E., Jonard, G., Richards, K. and Morris, T.J. (1985). Nucleotide sequence and genome organisation of carnation mottle virus RNA. *Nucl. Acids Res.* **13**, 6663–6677.

Guilley, H., Richards, K.E. and Jonard, G. (1995). Nucleotide sequence of beet mild yellowing virus RNA. *Arch. Virol.* **140**, 1109–1118.

Gultyaev, A., van Barenburg, E. and Plaij, C. (1994). Similarities between the secondary structure of satellite tobacco mosaic virus and tobamovirus RNAs. *J. Gen. Virol.* **75**, 2851–2856.

Gumpf, D.J., Cunningham, D.S., Heick, J.A. and Shannon, L.M. (1977). Amino acid sequence in the proteolytic glycopeptide of barley stripe mosaic virus. *Virology* **78**, 328–330.

Gunasinghe, U.B., Irwin, M.E. and Karnpmeier, G.E. (1988). Soybean leaf pubescence affects aphid vector transmission and field spread of soybean mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* **112**, 259–272.

Gupta, B.M., Chandra, K., Verma, H.N. and Verma, G.S. (1974). Induction of antiviral resistance in *Nicotiana glutinosa* plants by treatment with *Trichothecium* polysaccharide and its reversal by actinomycin D. *J. Gen. Virol.* **24**, 211–213.

Gura, T. (2000). A silence that speaks volumes. *Nature* **404**, 804–808.

Gustafson, F.G. and Armour, S.L. (1986). The complete nucleotide sequence of RNA β from the type strain of barley stripe mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* **14**, 3895–3909.

Gustafson, G.D., Larkins, B.A. and Jackson, A.O. (1981). Comparative analysis of polypeptides synthesised *in vivo* and *in vitro* by two strains of barley stripe mosaic virus. *Virology* **111**, 579–587.

Gustafson, G.D., Hunter, B., Hanau, R., Armour, S.L. and Jackson, A.O. (1987). Nucleotide sequence and genetic organisation of barley stripe mosaic virus RNAλ. *Virology* **158**, 394–406.

Gustafson, G.D., Armour, S.L., Gamboa, G.C., Burgett, S.G. and Shepherd, J.W. (1989). Nucleotide sequence of barley stripe mosaic virus RNAα: RNAα encodes a single polypeptide with homology to corresponding proteins from other viruses. *Virology* **170**, 370–377.

Gutierrez, C. (1998). The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 492–497.

Gutierrez, C. (1999). Geminivirus DNA replication. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 313–329.

Gutierrez, C. (2000a). DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* **19**, 792–799.

Gutierrez, C. (2000b). Geminiviruses and the plant cell cycle. *Plant Mol. Biol.* **43**, 763–772.

Guy, P.L. (1988). Pasture ecology of barley yellow dwarf viruses at Sanford, Tasmania. *Plant Pathol.* **37**, 546–550.

Guy, P.L. and Gibbs, A.J. (1985). Further studies on turnip yellow mosaic tymovirus isolates from an endemic Australian Cardamine. *Plant Pathol.* **34**, 532–544.

Guy, P.L., Webster, D.E. and Davis, L. (1998). Pests of non-indigenous organisms: hidden costs of introduction. *Trends Ecol. Evol.* **13**, 111.

Gwynn, G.R., Reilly, K.R., Komn, J.J., Burk, L.G. and Reed, S.M. (1986). Genetic resistance to tobacco mosaic virus, cyst nematodes root-knot nematodes and wildfire from *Nicotiana repanda* incorporated into *N. tabacum*. *Plant Dis.* **70**, 958–962.

Haas, B., Klanner, A., Ramm, K. and Sänger, H.L. (1988). The 7S RNA from tomato leaf tissue resembles a signal recognition particle RNA and exhibits a remarkable sequence complementarity to viroids. *EMBO J.* 7, 4063–4074.

Haber, S., Polston, J.E. and Bird, J. (1987). Use of DNA to diagnose plant diseases caused by single-stranded DNA plant viruses. *Can. J. Plant Pathol.* **9**, 156–161.

Haberlé, A.M., Stussi-Garaud, C., Schmitt, C. *et al.* (1994). Detection by immunogold labeling of P75 readthrough protein near an extremity of beet necrotic yellow vein virus particles. *Arch. Virol.* **134**, 195–203.

Habili, N. and Symons, R.H. (1989). Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on the sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. *Nucl. Acids Res.* **17**, 9543–9555.

Hacker, D.L. (1995). Identification of a coat protein-binding site on southern bean mosaic virus RNA *Virology* **207**, 562–565.

Hacker, D.L. and Fowler, B.C. (2000). Complementation of the host range restriction of southern cowpea mosaic virus in bean by southern bean mosaic virus. *Virology* **266**, 140–149.

Hadidi, A. (1986). Relationship of viroids and certain other plant pathogenic nucleic acids to group I and II introns. *Plant Mol. Biol.* **7**, 129–142.

Hadidi, A. (1988). Synthesis of disease associated proteins in viroid-infected tomato leaves and binding of viroid to host proteins. *Phytopathology* **78**, 575–578.

Hadidi, A. and Yang, X. (1990). Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *J. Virol. Methods* **30**, 261–270.

Hadidi, A., Cress, D.E. and Diener, T.O. (1981). Nuclear DNA from uninfected or potato spindle tuber viroid-infected tomato plants contains no detectable sequences complementary to cloned double-stranded viroid cDNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **78**, 6932–6935.

Hadidi, A., Khetarpal, R.K. and Koganezawa, H. (eds) (1998). *Plant Virus Disease Control*. APS Press, St. Paul, MN.

Hafner, G.J., Stafford, M.R., Wolter, L.C., Harding, R.M. and Dale, J.L. (1997a). Nicking and joining activity of the banana bunchy top virus replication protein *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **78**, 1795–1799.

Hafner, G.J., Harding, R.M. and Dale, J.L. (1997b). A DNA primer associated with banana bunchy top virus. *J. Gen. Virol.* **78**, 479–486.

Hafner, M.S. and Nadler, S.A. (1988). Phylogenetic trees support the coevolution of parasites and their hosts. *Nature (Lond.)* **332**, 258–259.

Hagborg, W.A.F. (1970). A device for injecting solutions and suspensions into thin leaves of plants. *Can. J. Bot.* **48**, 1135–1136.

Hagedorn, D.J. and Gritton, E.T. (1973). Inheritance of resistance to pea seed-borne mosaic virus. *Phytopathology* **63**, 1130–1133.

Hagen, L.S., Lot, H., Godon, C., Tepfer, M. and Jacquemond, M. (1994). Infection of *Theobroma cacao* using cloned DNA of cacao swollen shoot virus and particle bombardment. *Phytopathology* **84**, 1239–1243.

Hagen, T.J., Taylor, D.B. and Meagher, R.B. (1982). Rocket immunoelectrophoresis assay for cauliflower mosaic virus. *Phytopathology* **72**, 239–242.

Hagiwara, K., Minobe, Y., Nozu, Y., Hibino, H., Kimura, I. and Omura, T. (1986). Component proteins and structure of rice ragged stunt virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 1711–1715.

Hagiwara, Y., Peremyslov, V.V. and Dolja, V.V. (1999). Regulation of closterovirus gene expression examined by insertion of a self-processing reporter and by northern hybridization. *J. Virol.* **73**, 7988–7993.

Hahn, P. and Shepherd, R.J. (1980). Phosphorylated proteins in cauliflower mosaic virus. *Virology* **107**, 295–297.

Hahn, P. and Shepherd, R.J. (1982). Evidence for a 58-kilodalton polypeptide as precursor of the coat protein of cauliflower mosaic virus. *Virology* **116**, 480–488.

Haigh, J. (1978). The accumulation of deleterious genes in a population—Muller's ratchet. *Theor. Popul. Biol.* **14**, 251–267.

Haight, E. and Gibbs, A. (1983). Effect of viruses on pollen morphology. *Plant Pathol.* **32**, 369–372.

Hajimorad, M.R. and Francki, R.I.B. (1988). Alfalfa mosaic virus isolates from lucerne in South Australia: biological variability and antigenic similarity. *Ann. Appl. Biol.* **113**, 45–54.

Hajimorad, M.R. and Hill, J.H. (2001). *Rsv1*-mediated resistance against soybean mosaic virus-N is hypersensitive response-independent at inoculation site, but has the potential to initiate a hypersensitive response-like mechanism. *Molec. Plant-Microbe Interact.* **14**, 587–598.

Haley, A., Hunter, T., Kiberstis, P. and Zimmern, D. (1995). Multiple serine phosphorylation sites on the 30 kDa TMV cell-to-cell movement protein synthesised in tobacco protoplasts. *Plant J.* **8**, 715–724.

Halk, E.L. and McGuire, J.M. (1973). Translocation of tobacco ringspot virus in soybean. *Phytopathology* **63**, 1291–1300.

Halk, E.L., Hus, H.T., Aebig, J. and Franke, J. (1984). Production of monoclonal antibodies against three ilarviruses and alfalfa mosaic virus and their use in serotyping. *Phytopathology* **74**, 367–372.

Hall, A.E. and Loomis, R.S. (1972). An explanation for the difference in photosynthetic capabilities of healthy and beet yellows virus-infected sugar beets (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **50**, 576–580.

Hall, J.D., Barr, R., Al-Abbas, A.H. and Crane, F.L. (1972). The ultrastructure of chloroplasts in mineral-deficient maize leaves. *Plant Physiol.* **50**, 404–409.

Halliwell, R.S. and Gazaway, W.S. (1975). Quantity of microinjected tobacco mosaic virus required for infection of single cultured tobacco cells. *Virology* **65**, 583–587.

Hämäläinen, J.H., Kekarainen, T., Gebhardt, C., Watanabe, K.N. and Valkonen, J.P.T. (2000). Recessive and dominant genes interfere with the vascular transport of potato virus A in diploid potatoes. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **13**, 402–412.

Hamamoto, H., Sugiyama, Y., Nakagawa, N. *et al.* (1993). A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systemic production of angiotensin-1-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato. *Bio/Technol.* **11**, 930–932.

Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950–952.

Hamilton, R.I. (1980). Defenses triggered by previous invaders: viruses. In: J.G. Horsfall and E.B. Cowling (eds) *Plant Disease: An Advanced Treatise*, Vol. 5, pp. 279–303. Academic Press, New York.

Hamilton, R.I. and Tremaine, J.H. (1996). Dianthoviruses: properties, molecular biology, ecology and control. In: B.D. Harrison and A.F. Murant (eds) *The Plant Viruses. Vol. 5: Polyhedral Virions and Bipartite RNA genomes*, pp. 251–282. Plenum Press, New York.

Hamilton, R.I., Leung, E. and Nichols, C. (1977). Surface contamination of pollen by plant viruses. *Phytopathology* **67**, 395–399.

Hamilton, R.I., Edwardson, J.R., Francki, R.I.B. *et al.* (1981). Guidelines for the identification and characterization of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **54**, 223–241.

Hamilton, W.D.O. and Baulcombe, D.L. (1989). Infectious RNA produced by *in vitro* transcription of a full-length tobacco rattle virus RNA1 cDNA. J. Gen. Virol. **70**, 963–968.

Hamilton, W.D.O., Bisaro, D.M., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W. (1983). Demonstration of the bipartite nature of the genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. *Nucl. Acids Res.* **11**, 7387–7396.

Hamilton, W.D.O., Boccara, M., Robinson, D.J. and Baulcombe, D.C. (1987). The complete nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA1. *J. Gen. Virol.* **68**, 2563–2575.

Hammond, J. (1982). Plantago as a host of economically important viruses. *Adv. Virus Res.* **27**, 103–140.

Hammond, J. (1998). Resistance to plant viruses: an overview. Breeding for resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 163–171. APS Press, St. Paul, MN.

Hammond, J. and Hull, R. (1981). Plantain virus X: a new potexvirus from *Plantago lanceolata*. *J. Gen. Virol.* **54**, 75–90.

Hammond, J. and Kamo, K.K. (1995). Effective resistance to potyvirus infection in transgenic plants expressing antisense RNA. *Mol. Plant Microb. Interact.* **8**, 674–682.

Hammond, J., Lecoq, H. and Raccah, B. (1999). Epidemiological risks from mixed infections and transgenic crops expressing viral genes. *Adv. Virus Res.* **54**, 180–314.

Hammond, J.M., Sproat, K.W., Wise, T.G., Hyatt, A.D., Jagadish, M.N. and Coupar, B.E.H. (1998). Expression of the potyvirus coat protein mediated by recombinant vaccinia virus and assembly of potyvirus-like particles in mammalian cells. *Arch. Virol.* **143**, 1433–1439

Hammond, R.W. and Owens, R.A. (1987). Mutational analysis of potato spindle tuber viroid reveals complex relationships between structure and infectivity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 3967–3971.

Hammond, R.W., Diener, T.O. and Owens, R.A. (1989). Infectivity of chimeric viroid transcripts reveals the presence of alternative processing sites in potato spindle tuber viroid. *Virology* **170**, 486–495.

Hammond, R.W., Smith, D.R. and Diener, T.O. (1990). Nucleotide sequence and proposed secondary structure of *Columnea* latent viroid: a natural mosaic of viroid sequences. *Nucl. Acids Res.* **17**, 10083–10094.

Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773–1791.

Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1997). Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 575–607.

Hampton, R., Ball, E. and de Boer, S. (eds) (1990). *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens: A Laboratory Manual*. APS Press, St. Paul, MN.

Hampton, R.O. (1966). Probabilities of failing to detect prune dwarf virus in cherry trees by bud indexing. *Phytopathology* **56**, 650–652.

Hampton, R.O. (1975). The nature of bean yield reduction by bean yellow and bean common mosaic viruses. *Phytopathology* **65**, 1342–1346.

Hampton, R.O. (1988). Health status (virus) of native North American *Humulus lupulus* in the natural habitat. *J. Phytopathol.* **123**, 353–362.

Hampton, R.O. and Francki, R.I.B. (1992). RNA-1 dependent seed transmissibility of cucumber mosaic virus in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* **82**, 127–130.

Hanada, K. (1984). Electrophoretic analysis of virus particles of fourteen cucmovirus isolates. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **50**, 361–367.

Hanada, K. and Francki, R.I.B. (1989). Kinetics of velvet tobacco mottle virus satellite RNA synthesis and encapsulation. *Virology* **170**, 48–54.

Hanada, K. and Harrison, B.D. (1977). Effects of virus genotype and temperature on seed transmission of nepoviruses. *Ann. Appl. Biol.* **85**, 79–92.

Hanada, K., Kusunoki, M. and Iwaki, M. (1986). Properties of virus particles, nucleic acid and coat protein of cycas necrotic stunt virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* **52**, 422–427.

Hanley-Bowdoin, L., Elmer, J.S. and Rogers, S.G. (1988). Transient expression of heterologous RNAs using tomato golden mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* **16**, 10511–10528.

Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S. and Robertson, D. (1999). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**, 71–106.

Hansen, A.J. (1989). Antiviral chemicals for plant disease control. *Crit. Rev. Plant Sci.* **8**, 45–88.

Hansen, A.J. and Lane, W.D. (1985). Elimination of apple chlorotic leafspot virus from apple shoot cultures by ribavirin. *Plant Dis.* **69**, 134–135.

Hansen, J.L., Long, A.M. and Schultz, S.C. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**, 1109–1122.

Harders, J., Lukacs, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, J.M. and Riesner, D. (1989). Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.* **8**, 3941–3949.

Harding, R.M., Burns, T.M., Hafner, G.J., Dietzgen, R. and Dale, J.L. (1993). Nucleotide sequence of the banana bunchy top genome contains a putative replicase gene. *J. Gen. Virol.* **74**, 323–328.

Hardy, S.F., German, T.L., Loesch-Fries, L.S. and Hall, T.C. (1979). Highly active template-specific RNA-dependent RNA polymerase from barley leaves infected with brome mosaic virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **76**, 4956–4960.

Hardy, V.G. and Teakle, D.S. (1992). Transmission of sowbane mosaic virus by *Thrips tabaci* in the presence and absence of virus-carrying pollen. *Ann. Appl. Biol.* **121**, 315–320.

Hare, J.D. and Dodds, J.A. (1987). Survival of the Colorado potato beetle on virus-infected tomato in relation to plant nitrogen and alkaloid content. *Entomol. Exp. Appl.* **44**, 31–35.

Hari, V., Siegel, A., Rozek, C. and Timberlake, W.E. (1979). The RNA of tobacco etch virus contains poly(A). *Virology* **92**, 568–571.

Harker, C.L., Woolston, C.J., Markham, P.G. and Maule, A.J. (1987a). Cauliflower mosaic virus aphid transmission factor protein is expressed in cells infected with some aphid non-transmissible isolates. *Virology* **160**, 252–254.

Harker, C.L., Mullineaux, P.M., Bryant, J.A. and Maule, A.J. (1987b). Detection of CaMV gene I and gene VI protein products *in vivo* using antisera raised to COOH-terminal β-galactosidase fusion proteins. *Plant Mol. Biol.* **8**, 275–287.

Harlan, J.R. (1976). Diseases as a factor in plant evolution. *Annu. Rev. Phytopathol.* 14, 31–51.

Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M. *et al.* (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**, 2110–2113.

Harper, G. and Hull, R. (1998). Cloning and sequence analysis of banana streak virus DNA. *Virus Genes* **17**, 271–278.

Harper, G., Dahal, G., Thottappilly, G. and Hull, R. (1999a). Detection of episomal banana streak badnavirus by IC-PCR. *J. Virol.* Meths. **79**, 1–8.

Harper, G., Osuji, J.O., Heslop-Harrison, J.S. and Hull, R. (1999b). Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: molecular and cytological evidence. *Virology* **255**, 207–213.

Harper, K. and Creamer, R. (1995). Hybridization detection of insect-transmitted plant viruse with digoxigenin-labelled probes. *Plant Dis.* **79**, 563–567.

Harper, K., Toth, R.L., Mayo, M.A. and Torrance, L. (1999c). Properties of a panel of single chain variable fragments against potato leafroll virus obtained from two phage display libraries. *J. Virol. Methods* **81**, 159–168.

Harrington, R., Dewar, A.M. and George, B. (1989). Forecasting the incidence of virus yellows in sugar beet in England. *Ann. Appl. Biol.* **114**, 459–469.

Harris, J.I. and Knight, C.A. (1952). Action of carboxypeptidase on tobacco mosaic virus. *Nature (London)* **170**, 613–614.

Harris, J.I. and Knight, C.A. (1955). Studies on the action of carboxypeptidase on tobacco mosaic virus. *J. Biol. Chem.* **214**, 215–230.

Harris, J.R. and Horne, R.W. (1994). Negative staining: a brief assessment of current technical benefits, limitations and future possibilities. *Micron* **25**, 5–13.

Harris, K.F. (1977). An ingestion–egestion hypothesis of non-circulative virus transmission. In: K.F. Harris, and K. Maramorosch (eds) *Aphids as Virus Vectors*, pp. 166–208. Academic Press, New York.

Harris, K.F. and Bradley, R.H.E. (1973). Tobacco mosaic virus: can aphids inoculate it into plants with their mouthparts? *Phytopathology* **63**, 1343–1345.

Harris, K.F. and Maramorosch, K. (eds) (1982). *Pathogens, Vectors and Plant Diseases: Approaches to Control.* Academic Press, New York.

Harris, K.F., Treur, B., Tsai, J. and Toler, R. (1981). Observations on leafhopper ingestion–egestion behaviour: its likely role in the transmission of non-circulative viruses and other plant pathogens. *J. Econ. Entomol.* **74**, 446–453.

Harrison, B.D. (1958). Ability of single aphids to transmit both avirulent and virulent strains of potato leaf roll virus. *Virology* **6**, 278–286.

Harrison. B.D. (1981). Plant virus ecology: ingredients, interactions and environmental influences. *Ann. Appl. Biol.* **99**, 195–209.

Harrison, B.D. (1985). Advances in geminivirus researrh. *Annu. Rev. Phytopathol.* **23**, 55–82.

Harrison, B.D. and Jones, R.A.C. (1970). Host range and some properties of potato mop-top virus. *Ann. Appl. Biol.* **65**, 393–402.

Harrison, B.D. and Jones, R.A.C. (1971). Effects of light and temperature on symptom development and virus content of tobacco leaves inoculated with potato mop-top virus. *Ann. Appl. Biol.* **67**, 377–387.

Harrison, B.D. and Murant, A.F. (1984). Involvement of plant virus-coded proteins in transmission of plant viruses by vectors. In: M.A. Mayo and K.R. Harrap (eds) *Vectors in Virus Biology*, pp. 1–36. Academic Press, London.

Harrison, B.D. and Nixon, H.L. (1959). Separation and properties of particles of tobacco rattle virus with different lengths. *J. Gen. Microbiol.* **21**, 569–581.

Harrison, B.D. and Roberts, I.M. (1968). Association of tobacco rattle virus with mitochondria. *J. Gen. Virol.* **3**, 121–124.

Harrison, B.D. and Robinson, D.J. (1999). Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses). *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**, 369–398.

Harrison, B.D. and Wilson, T.M.A. (1999). Milestones in the research on tobacco mosaic virus. *Phil. Trans.R. Soc. Lond. B* **354**, 521–529.

Harrison, B.D. and Winslow, R.D. (1961). Laboratory and field studies on the relation of arabis mosaic virus to its nematode vector *Xiphinema diversicaudatum* Micoletzky. *Ann. Appl. Biol.* **49**, 621–633.

Harrison, B.D. and Woods, R.D. (1966). Serotypes and particle dimensions of tobacco rattle viruses from Europe and America. *Virology* **28**, 610–620.

Harrison, B.D., Peachey, J.E. and Winslow, R.D. (1963). The use of nematicides to control the spread of arabis mosaic virus by *Xiphinema diversicaudatum* (Micol). *Ann. Appl. Biol.* **52**, 243–255.

Harrison, B.D., Finch, J.T., Gibbs, A.J. *et al.* (1971). Sixteen groups of plant viruses. *Virology* **45**, 356–363.

Harrison, B.D., Robertson, W.M. and Taylor, C.E. (1974). Specificity of retention and transmission of viruses by nematodes. *J. Nematol.* **6**, 155–164.

Harrison, B.D., Kubo, S., Robinson, D.J. and Hutcheson, A.M. (1976). The multiplication cycle of tobacco rattle virus in tobacco mesophyll protoplasts. *J. Gen. Virol.* **33**, 237–248.

Harrison, B.D., Robinson, D.J., Mowat, W.P. and Duncan, G.H. (1983). Comparison of nucleic acid hybridisation and other tests for detecting tobacco rattle virus in narcissus plants and potato tubers. *Ann. Appl. Biol.* **102**, 331–338.

Harrison, B.D., Mayo, M.A. and Baulcombe, D.C. (1987). Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature (Lond.)* **328**, 799–802.

Harrison, B.D., Liu, Y.L., Khalid, S., Hameed, S., Otim-Nape, G.W. and Robinson, D.J. (1997). Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. *Ann. Appl. Biol.* **130**, 61–75.

Harrison, S.C., Olson, A.J., Schutt, C.E., Winkler, F.K. and Bricogne, G. (1978). Tomato bushy stunt virus at 2.9 Å resolution. *Nature (London)* **276**, 368–373.

Hartman, K.A., McDonald-Ordzie, P.E., Kaper, J.M., Prescott, B. and Thomas, G.J. (1978). Studies of virus structure by laser Raman spectroscopy: turnip yellow mosaic virus and capsids. *Biochemistry* **17**, 2118–2123.

Hartman, R.D. (1974). Dasheen mosaic virus and other phytopathogens eliminated from caladium, taro and cocoyam by culture of shoot tips. *Phytopathology* **64**, 237–240.

Harveson, R.M., Rush, C.M. and Wheeler, T.A. (1996). The spread of beet necrotic yellow vein virus from point source inoculations as influenced by irrigation and tillage. *Phytopathology* **86**, 1242–1247.

Harvey, J.D. (1973). Diffusion coefficients and hydrodynamic radii of three spherical RNA viruses by laser light scattering. *Virology* **56**, 365–368.

Harvey, J.D., Farrell, J.A. and Bellamy, A.R. (1974). Biophysical studies of reovirus type 3: II. Properties of the hydrated particle. *Virology* **62**, 154–160.

Hasegawa, A., Verver, J., Shimada, A. *et al.* (1989). The complete nucleotide sequence of soybean chlorotic mottle virus DNA and the identification of a novel promoter. *Nucl. Acids Res.* **17**, 9993–10013.

Haselkorn, R. (1962). Studies on infectious RNA from turnip yellow mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **4**, 357–367.

Haseloff, J., Mohamed, N.A. and Symons, R.H. (1982). Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts. *Nature* **229**, 316–321.

Haseloff, J., Goelet, P., Zimmern, D., Ahlquist, P., Dasgupta, R. and Kaesberg, P. (1984). Striking similarities in amino acid sequence among non-structural proteins encoded by RNA viruses that have dissimilar genomic organisation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **81**, 4358–4362.

Hatta, T. (1976). Recognition and measurement of small isometric virus particles in thin sections. *Virology* **69**, 237–245.

Hatta, T. and Francki, R.I.B. (1976). Anatomy of virus-induced galls on leaves of sugarcane infected with Fiji disease virus and the cellular distribution of virus particles. *Physiol. Plant Pathol.* **9**, 321–330.

Hatta, T. and Francki, R.I.B. (1977). Morphology of Fiji disease virus. *Virology* **76**, 797–807.

Hatta, T. and Francki, R.I.B. (1981a). Identification of small polyhedral virus particles in thin sections of plant cells by an enzyme cytochemical technique. *J. Ultrastruct. Res.* **74**, 116–129.

Hatta, T. and Francki, R.I.B. (1981b). Cytopathic structures associated with tonoplasts of plant cells infected with cucumber mosaic and tomato aspermy viruses. *J. Gen. Virol.* **53**, 343–346.

Hatta, T. and Francki, R.I.B. (1981c). Development and cytopathology of virus-induced galls on leaves of sugarcane infected with Fiji disease virus. *Physiol. Plant Pathol.* **19**, 337–346.

Hatta, T. and Francki, R.I.B. (1984). Differences in the morphology of isometric particles of some plant viruses stained with uranyl acetate as an aid to their identification. *J. Virol. Methods* **9**, 237–247.

Hatta, T. and Matthews, R.E.F. (1974). The sequence of early cytological changes in Chinese cabbage leaf cells following systemic infection with turnip yellow mosaic virus. *Virology* **59**, 383–396.

Hatta, T. and Matthews, R.E.F. (1976). Sites of coat protein accumulation in turnip yellow mosaic virus-infected cells. *Virology* **73**, 1–16.

Hatta, T., Nakamoto, T., Takagi, Y. and Ushiyama, R. (1971). Cytological abnormalities of mitochondria induced by infection with cucumber green mottle mosaic virus. *Virology* **45**, 292–297.

Hatta, T., Bullivant, S. and Matthews, R.E.F. (1973). Fine structure of vesicles induced in chloroplasts of Chinese cabbage leaves by infection with turnip yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **20**, 37–50.

Havelda, Z. and Burgyán, J. (1995). 3′ terminal putative stem-loop structure required for the accumulation of cymbidium ringspot virus RNA. *Virology* **214**, 269–272.

Havelda, Z., Dalmay, T. and Burgyán, J. (1995). Localization of the *cis*-acting sequences essential for cymbidium ringspot tombusvirus defective interfering RNA replication. *J. Gen. Virol.* **76**, 2311–2316.

Hawkes, J.G. (1967). The history of the potato. Part III. *J. R. Hortic. Soc.* **92**, 288–302.

Hay, J.M., Jones, M.C., Blakebrough, M., Dasgupta, I., Davies, J.W. and Hull, R. (1991). An analysis of the sequence of an infectious clone of rice tungro bacilliform virus, a plant pararetrovirus. *Nucl. Acids Res.* **19**, 2615–2621.

Hay, J.M., Grieco, F., Druka, A., Pinner, M., Lee, S. and Hull, R. (1994). Detection of rice tungro bacilliform virus gene products *in vivo*. *Virology* **205**, 430–437.

Hayakawa, T., Mizukami, M., Nakamura, I. and Suzuki, M. (1989). Cloning and sequencing RNA1 cDNA from cucumber mosaic virus strain O. *Gene* **85**, 533–540.

Hayakawa, T., Zhu, Y, Itoh, K. *et al.* (1992). Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 9865–9869.

Hayashi, T. (1974). Fate of tobacco mosaic virus after entering the host cell. *Jpn J. Microbiol.* **18**(4), 279–286.

Hayes, R.J. and Buck, K.W. (1990). Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* **63**, 363–368.

Hayes, R.J., Brough, C.L., Prince, V.E., Coutts, R.H.A and Buck, K.W. (1988a). Infection of *Nicotiana benthamiana* with uncut cloned tandem dimers of tomato golden mosaic virus DNA. *J. Gen. Virol.* **69**, 209–218.

Hayes, R.J., MacDonald, H., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W. (1988b). Agroinfection of *Tritium aestivum* with cloned DNA of wheat dwalf virus. *J. Gen. Virol.* **69**, 891–896.

Hayes, R.J., MacDonald, H., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W. (1988c). Priming of complimentary DNA synthesis *in vitro* by small DNA molecules tightly bound to virion DNA of wheat dwalf virus. *J. Gen. Virol.* **69**, 1345–1350.

Hayes, R.J., Petty, I.T.D., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W. (1988d). Gene amplification and expression in plants by a replicating geminivirus vector. *Nature (Lond.)* **334**, 179–182.

Hayes, R.J., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W. (1988e). Agroinfection of *Nicotiana* spp. with cloned DNA of tomato golden mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **69**, 1487–1496.

Hayes, R.J., Tousch, D., Jacquemond, M., Pereira, V.C., Buck, K.W. and Tepfer, M. (1992). Complete replication of a satellite RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **73**, 1597–1600.

Hayley, A., Zhan, X., Richardson, K.A., Head, K. and Morris, B.A.M. (1992). Regulation of the activation of African cassava mosaic virus promoters by the AC1, AC2 and AC3 gene products. *Virology* **188**, 905–909.

Haynes, J.R., Cunningham, J., von Seefried, A., Lennick, M., Garvin, R.T. and Shen S.-H. (1986). Development of a genetically engineered, candidate polio vaccine employing the self-assembling properties of tobacco mosaic virus coat protein. *Bio/Technology* **4**, 637–641.

He, X.-H., Rao, A.L.N. and Creamer, R. (1997). Characterization of beet yellows closterovirus-specific RNAs in infected plants and protoplasts. *Phytopathology* **87**, 347–352.

Heard, A.J. and Chapman, P.F. (1986). A field study of the pattern of local spread of ryegrass mosaic virus in mown grassland. *Ann. Appl. Biol.* **108**, 341–345.

Hearne, P.Q., Knorr, D.A., Hillman, B. and Morris, T.J. (1990). The complete genome structure and synthesis of infectious RNA from clones of tomato bushy stunt virus. *Virology* **177**, 141–151.

Heath, M.C. (2000). Advances in imaging the cell biology of plant–microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**, 443–459.

Heathcote, G.D. (1978). Review of losses caused by virus yellows in English sugar beet crops and the cost of partial control with insecticides. *Plant Pathol.* **27**, 12–17.

Heathcote, G.D. and Broadbent, L. (1961). Local spread of potato leaf roll and Y viruses. *Eur. Potato J.* **4**, 138–143.

Heaton, L.A., Hillman, B.I., Hunter, B.G., Zuidema, D. and Jackson, A.O. (1989a). A physical map of the genome of Sonchus yellow net virus, a plant rhabdovirus with six genes and conserved genejunction sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 8665–8668.

Heaton, L.A., Hillman, B.I., Hunter, B.G., Zuidema, D. and Jackson, A.O. (1989b). Physical map of the genome of Sonchus yellow net virus, a plant rhabdovirus with six genes and conserved junction sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 8665–8668.

Hebers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H.-P., Hajirezaei, M. and Sonnewald, U. (2000). Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol. Plant Pathol.* **1**, 51–59.

Hebert, T.T. (1963). Precipitation of plant viruses by polyethylene glycol. *Phytopathology* **53**, 362.

Hebrard, E., Drucker, M., Leclerc, D., Hohn, T. *et al.* (2001). Biochemical characterization of the helper component of cauliflower mosaic virus. *J. Virol.* In press.

Hecht, E.I. and Bateman, D.F. (1964). Non-specific acquired resistance to pathogens resulting from localised infections by *Thielaviopsis basicola* or viruses in tobacco leaves. *Phytopathology* **54**, 523–530.

Hedrick, J.L. and Smith, A.J. (1968). Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Archiv. Biochem. Biophys.* **126**, 155–164.

Heese-Peck, A. and Raikhel, N.V. (1998). The nuclear pore complex. *Plant Mol. Biol.* **38**, 145–162.

Hefferson, K.L., Khalilian, H., Xu, H. and AbouHaidar, M.G. (1997). Expression of the coat protein of potato virus X from a dicistronic mRNA in transgenic potato plants. *J. Gen. Virol.* **78**, 3051–3059.

Hehn, A., Fritsch, C., Richards, K.E., Guilley, H. and Jonard, G. (1997). Evidence for *in vitro* and *in vivo* autolytic processing of the primary translation product of beet necrotic yellow vein virus RNA 1 by a papain-like proteinase. *Arch. Virol.* **142**, 1051–1058.

Heide, M. and Lange, L. (1988). Detection of potato leaf roll virus and potato viruses M, S, X and Y by dot immunobinding on plain paper. *Potato Res.* **31**, 367–373.

Heijbroek, W. (1988). Dissemination of rhizomania by soil, beet seeds and stable manure. *Neth. J. Plant Pathol.* **94**, 9–15.

Heijtink, R.A. and Jaspars, E.M.J. (1974). RNA contents of abnormally long particles of certain strains of alfalfa mosaic virus. *Virology* **59**, 371–382.

Heijtink, R.A. and Jaspars, E.M.J. (1976). Characterization of two morphologically distinct top component a particles from alfalfa mosaic virus. *Virology* **69**, 75-80.

Heijtink, R.A., Houwing, C.J. and Jaspars, E.M.J. (1977). Molecular weights of particles and RNAs of alfalfa mosaic virus: number of subunits in protein capsids. *Biochemistry* **16**, 4684–4693.

Hein, A. (1971). Zur Wirkung von Öl auf die Virusübertragung durch Blattäiuse. *Phytopathol. Z.* **71**, 42–48.

Hein, A. (1987). A contribution to the effect of fungicides and additives for formulation on the rhizomania infection of sugar beets (beet necrotic yellow vein virus). *J. Plant Dis. Prot.* **94**, 250–259.

Heinlein, M., Epel, B.L., Padgett, H.S. and Beachy, R.N. (1995). Interaction of tobamovirus movement protein with the plant cytoskeleton. *Science* **270**, 1983–1985.

Heinlein, M., Padgett, H.S., Gens, J.S. *et al.* (1998). Changing patterns of localization of TMV movement protein and replicase to endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* **10**, 1107–1120.

Heinrichs, E.A., Rapusas, H.R., Aquino, G.B. and Palis, F. (1986). Integration of host plant resistance and insecticides in the control of *Nephotettix virescens* (Homoptera: Cicadellidae), a vector of rice tungro virus. *J. Econ. Entomol.* **79**, 437–443.

Hellen, C.U.T. and Cooper, J.I. (1987). The genome-linked protein of cherry leaf roll virus. *J. Gen. Virol.* **68**, 2913–2917.

Hellmann, G.M., Shaw, J.G. and Rhoads, R.E. (1988). *In vitro* analysis of tobacco vein mottling virus NI_a cistron: evidence for a virus-encoded protease. *Virology* **163**, 554–562.

Hellwald, K.H., Zimmermann, C. and Buchenauer, H. (2000). RNA 2 of cucumber mosaic virus subgroup 1 strain NT-CMV is involved in the induction of severe symptoms in tomato. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**, 95–99.

Helms, K. and Wardlaw, I.F. (1976). Movement of viruses in plants: long distance movement of tobacco mosaic virus in *Nicotiana glutinosa*. In: I.F. Wardlaw and J.B. Passioura (eds) *Transport and Transfer Processes in Plants*, pp. 283–293. Academic Press, New York.

Helms, K., Waterhouse, P.M. and Muller, W.J. (1985). Subterranean clover red leaf virus disease: effects of temperature on plant symptoms, growth and virus content. *Phytopathology* **75**, 337–341.

Hemenway, C., Fang, R.-X., Kaniewski, W.K., Chua, N.-H. and Turner, N.E. (1988). Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J.* **7**, 1273–1280.

Hemida, S.K., Murant, A.F. and Duncan, G.H. (1989). Purification and some particle properties of anthricus yellows virus, a phloem-limited semipersistent aphid-borne virus. *Ann. Appl. Biol.* **114**, 71–86.

Hemmati, K. and McLean, D.L. (1977). Gamete–seed transmission of alfalfa mosaic virus and its effect on seed germination and yield in alfalfa plants. *Phytopathology* **67**, 576–579.

Hemmer, O., Meyer, M., Greif, C. and Fritsch, C. (1987). Comparison of the nucleotide sequences of five tomato black ring virus satellite RNAs. *J. Gen. Virol.* **68**, 1823–1833.

Hemmings-Mieszczak, M. and Hohn, T. (1999). A stable hairpin preceded by a short open reading frame promotes nonlinear ribosome migration on a synthetic mRNA leader. *RNA* **5**, 1149–1157.

Hemmings-Mieszczak, M.W., Steger, G. and Hohn, T. (1997). Alternative structures of the cauliflower mosaic virus 35S RNA leader: implications for viral expression and replication. *J. Mol. Biol.* **267**, 1075–1088.

Hemmings-Mieszczak, M.W., Steger, G. and Hohn, T. (1998). Regulation of CaMV translation is mediated by a stable hairpin in the leader. *RNA* **4**, 101–111.

Hennig, W. (1981). *Insect Phylogeny*. Wiley, New York.

Herman, T. and Patel, D.J. (1999). Stitching together RNA tertiary architectures. *J. Mol. Biol.* **294**, 829–849.

Hernández, C. and Flores, R. (1991). Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 3711–3715.

Hernández, C. Daros, J.A., Elena, S.F., Moya, A. and Flores, R. (1992). The strands of both polarities of a small circular RNA from carnation self-cleave *in vitro* through alternative double- and single-hammerhead structures. *Nucl. Acids Res.* **20**, 6323–6329.

Hernández, C, Visser, P.B., Brown, D.J.F. and Bol, J.F. (1997). Transmission of tobacco rattle virus isolate PpK20 by its nematode vector requires one of the two non-structural genes in the viral RNA2. *J. Gen. Virol.* **78**, 465–467.

Hershey, A.D. and Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* **36**, 39–56.

Hertzog, E., Guilley, H., Manohar, S.K. *et al.* (1994). Complete nucleotide sequence of peanut clump virus RNA 1 and relationships with other fungus-transmitted rod-shaped viruses. *J. Gen. Virol.* **75**, 3147–3155.

Herzog, E., Guilley, H. and Fritsch, C. (1995). Translation of the second gene of peanut clump virus RNA 2 occurs by leaky scanning *in vitro*. *Virology* **208**, 215–225.

Heuss, K., Liu, Q., Hammerschlag, F.A. and Hammond, R.W. (1999). A cDNA probe detects *Prunus* necrotic ringspot virus in three peach cultivars after micrografting and in peach shots following long-term culture at 4 degrees C. *HortScience* **34**, 346–347.

Hewish, D.R., Shukla, D.D. and Gough, K.H. (1986). The use of biotin-conjugated antisera in immunoassays for plant viruses. *J. Virol. Methods* **13**, 79–85.

Hewitt, W.B. and Chiarappa, L. (eds) (1977). *Plant Health and Quarantine in International Transfer of Genetic Resources*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Hewitt, W.B., Raski, D.J. and Goheen, A.C. (1958). Nematode vector of soilborne fan-leaf virus of grapevines. *Phytopathology* **48**, 586–595.

Heyraud, F., Matzeit, V., Kammann, M., Schaefer, S., Schell, J. and Gronenborn, B. (1993a). Identification of the initiation sequence for viral-strand DNA synthesis of wheat dwarf virus. *EMBO J.* **12**, 4445–4452.

Heyraud, F., Matzeit, V., Schaefer, S., Schell, J. and Gronenborn, B. (1993b). The conserved nonaucleotide motif of the geminivirus stem-loop sequence promotes replicational release of virus molecules from redundant copies. *Biochimie* **75**, 605–615.

Heywood, V.H. (1978). *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press, London.

Hiatt, A. Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature (Lond.)* **342**, 76–78.

Hibi, T. and Saito, Y. (1985). A dot immunobinding assay for the detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. *J. Gen. Virol.* **66**, 1191–1194.

Hibi, T., Rezelman, G. and van Kammen, A. (1975). Infection of cowpea mesophyll protoplasts with cowpea mosaic virus. *Virology* **64**, 308–318.

Hibino, H. and Cabauatan, P.Q. (1987). Infectivity neutralization of rice tungro-associated viruses acquired by vector leafhoppers. *Phytopathology* **77**, 473–476.

Hibino, H., Tiongco, E.R., Cabunagan, R.C. and Flores, Z.M. (1987). Resistance to rice tungro-associated virus in rice under experimental and natural conditions. *Phytopathology* **77**, 871–875.

Hidaka, S., Hanada, K., Ishikawa, K. and Miura, K.-I. (1988). Complete nucleotide sequence of two new satellite RNAs associated with cucumber mosaic virus. *Virology* **164**, 326–333.

Hiddinga, H.J., Crum, C.J., Hu, J. and Roth, D.A. (1988). Viroid-induced phosphorylation of a host protein related to a dsRNA-dependent protein kinase. *Science* **241**, 451–453.

Hiebert, E. and McDonald, J.G. (1973). Characterisation of some proteins associated with viruses in the potato Y group. *Virology* **56**, 349–361.

Hiebert, E., Bancroft, J.B. and Bracker, C.E. (1968). The assembly *in vitro* of some small spherical viruses, hybrid viruses and other nucleoproteins. *Virology* **34**, 492–508.

Higgins, C.M., Dietzgen, R.G., Akin, H.M., Sudarsono, Chen, K. and Xu, Z. (1999). Biological and molecular variability of peanut stripe potyvirus. *Curr. Topics Virol.* **1**, 1–26.

Higgins, T.J.V., Goodwin, P.B. and Whitfeld. P.R. (1976). Occurrence of short particles in beans infected with the cowpea strain of TMV: II. Evidence that short particles contain the cistron for coat-protein. *Virology* **71**, 486–497.

Higgins, T.J.V., Whitfeld, P.R. and Matthews, R.E.F. (1978). Size distribution and *in vitro* translation of the RNAs isolated from turnip yellow mosaic virus nucleoproteins. *Virology* **84**, 153–161.

Hilborn, M.T., Hyland, F. and McCrum, R.C. (1965). Pathological anatomy of apple trees affected by the stem-pitting virus. *Phytopathology* **55**, 34–39.

Hilf, M.E. and Dawson, W.O. (1993). The tobamovirus capsid protein functions as a host-specific determinant of long-distance movement. *Virology* **193**, 106–114.

Hilf, M.E., Karasev, A.V., Pappu, H.R., Gumpf, S.M., Niblett, C.L. and Garnsey, S.M. (1995). Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* **208**, 576–582.

Hill, R.E. and Hastie, N.D. (1987). Accelerated evolution in the reactive centre regions of serine protease inhibitors. *Nature (Lond.)* **326**, 96–99.

Hill, S.A. (1984). *Methods in Plant Virology*. Blackwell, Oxford.

Hill, S.A. (1987). Cereal virus diseases: contrasting experience. In: M.S. Wolfe and C.E. Caten (eds) *Populations of Plant Pathogens: Their Dynamics and Genetics*, pp. 149–159. Blackwell, Oxford.

Hill, S.A. and Torrance, L. (1989). Rhizomania disease of sugar beet in England. *Plant Pathol.* **38**, 114–122.

Hillman, B.I. and Nuss, D.L. (1999). Phytoreoviruses (*Reoviridae*). . In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1262–1267. Academic Press, San Diego.

Hillman, B.I., Morris, T.J. and Schlegel, D.E. (1985). Effects of low-molecular-weight RNA and temperature on tomato bushy stunt virus symptom expression. *Phytopathology* **75**, 361–365.

Hillman, B.I., Carrington, J.C. and Morris, T.J. (1987). A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell* **51**, 427–433.

Hills, G.J., Plaskitt, K.A., Young, N.D. *et al.* (1987). Immunogold localization of the intracellular sites of structural and nonstructural tobacco mosaic virus proteins. *Virology* **161**, 488–496.

Hinegardner, R. (1976). Evolution of genome size. In: F.J. Ayala (ed.) *Molecular Evolution*, pp. 179–199. Sinauer, Sunderland, MA.

Hiraga, S., Iti, H., Yamakawa, H. *et al.* (2000). An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate and ethephon. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 210–216.

Hirikoshi, M., Nakayama, M., Yamaoka, N., Furusawa, I. and Shishiyama, J. (1987). Brome mosaic virus coat protein inhibits viral RNA synthesis *in vitro*. *Virology* **158**, 15–19.

Hirochika, H. and Hayashi, K. (1991). A new strategy to improve a cauliflower mosaic virus vector. *Gene* **105**, 239–241.

Hirochika, H., Takatsuji, H., Ubasawa, A. and Ikeda, J. (1985). Site-specific deletion in cauliflower mosaic virus DNA: possible involvement of RNA splicing and reverse transcription. *EMBO J.* **4**, 1673–1680.

Hiruki, C. and Tu, J.C. (1972). Light and electron microscopy of potato virus M lesions and marginal tissue in red kidney bean. *Phytopathology* **62**, 77–85.

Hizi, A., Henderson, L.E., Copeland, T.D., Sowder, R.C., Hixon, C.V. and Oroszlan, S. (1987). Characterisation of mouse mammary tumor virus gag-pro gene products and the ribosomal frameshift site by protein sequencing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 7041–7045.

Hobbs, H.A., Kuhn, C.W., Papa, K.E. and Brantley, B.B. (1987). Inheritance of non necrotic resistance to southern bean mosaic virus in cowpea. *Phytopathology* **77**, 1624–1629.

Hofer, J.M.I., Dekker, E.L., Reynolds, H.V., Woolston, C.J., Cox, B.S and Mullineaux, P.M. (1992). Coordinate regulation of replication and virion sense gene expression in wheat dwarf virus. *Plant Cell* **4**, 213–223.

Hoffmann, K., Sackey, S.T., Maiss, E., Adomako, D. and Vetten, H.J. (1997). Immunocapture polymerase chain reaction for the detection and characterization of cacao swollen shoot virus 1A isolates. *J. Phytopathol.* **145**, 205–212.

Hogle, J.M., Maeda, A. and Harrison, S.C. (1986). Structure and assembly of turnip crinkle virus 1: X-ray crystallographic structure analysis at 3.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **191**, 625–638.

Hogue, R. and Asselin, A. (1984). Polyacrylamide–agarose gel electrophoretic analysis of tobacco mosaic virus disassembly intermediates. *Can. J. Bot.* **62**, 2336–2339.

Hohn, T. (1999). Plant Pararetroviruses—Caulimoviruses: molecular biology. . In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1281–1285.. Academic Press, San Diego.

Hohn, T. and Fütterer, J. (1992). Transcriptional and translational control of gene expression in cauliflower mosaic virus. *Curr. Opin. Genetic. Devel.* **2**, 90–96.

Hohn, T. and Fütterer, J. (1997). The proteins and functions of plant pararetroviruses: known and unknowns. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**, 133–161.

Hohn, T., Hohn, B. and Pfeiffer, P. (1985). Reverse transcription in CaMV. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 205–209.

Holland, J. and Domingo, E. (1998). Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* **16**, 13–21.

Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S. and Vande Pol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**, 1577–1585.

Hollings, M. (1965). Disease control through virus-free stock. *Annu. Rev. Phytopathol.* **3**, 367–396.

Hollings, M. and Stone, O.M. (1970). The long-term survival of some plant viruses preserved by lyophilization. *Ann. Appl. Biol.* **65**, 411–418.

Holmes, F.O. (1929). Local lesions in tobacco mosaic. *Bot. Gaz. (Chicago)* **87**, 39–55.

Holmes, F.O. (1931). Local lesions of mosaic in *Nicotiana tabacum* L. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **3**, 163–172.

Holmes, F.O. (1934). A masked strain of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* **24**, 845–873.

Holmes, F.O. (1938). Inheritance of resistance to tobacco mosaic disease in tobacco. *Phytopathology* **28**, 553–561.

Holmes, F.O. (1939). *Handbook of Phytopathogenic Viruses*. Burgess, Minneapolis, MI.

Holmes, F.O. (1946). A comparison of experimental host ranges of tobacco-etch and tobacco mosaic viruses. *Phytopathology* **36**, 643–659.

Holmes, F.O. (1955). Elimination of spotted wilt virus from dahlias by propagation of tip cuttings. *Phytopathology* **45**, 224–226.

Holmes, F.O. (1964). Symptomology of viral diseases in plants. In: M.K. Corbett and H.D. Sisler (eds) *Plant Virology*, pp. 17–38. University of Florida Press, Gainesville.

Holness, C.L., Lomonossoff, G.P., Evans, D. and Maule, A.J. (1989). Identification of the initiation codons for translation of cowpea mosaic virus middle component RNA using site-directed mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Virology* **172**, 311–320.

Holt, C.A. (1992). Localization of plant pathogens. In: P.D. Reid and R.F. Pont-Lezica (eds) *Tissue Printing. Tools for the Study of Anatomy, Histochemistry, and Gene Expression*, pp. 125–137. Academic Press, San Diego.

Holt, J. and Chancellor, T.C.B. (1997). A model of plant virus disease epidemics in asynchronously-planted cropping systems. *Plant Pathol.* **46**, 490–501.

Holt, J. Jeger, M.J., Thresh, J.M. and Otim-Nape, G.W. (1997). An epidemiological model incorporating vector population dynamics applied to African cassava mosaic virus disease. *J. Appl. Ecol.* **34**, 793–806.

Hong, Y and Stanley, J. (1995). Regulation of African cassava mosaic virus complementary-sense gene expression by N-terminal sequences of the replication-associated protein AC1. *J. Gen. Virol.* **76**, 2415–2422.

Hong, Y., Robinson, D.J. and Harrison, B.D. (1993). Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted geminiviruses in cassava. *J. Gen. Virol.* **74**, 2437–2443.

Hong, Y., Levay, K., Murphy, J.F., Klein, P.G., Shaw, J.G. and Hunt, A.G. (1995). A potyvirus-encoded polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. *Virology* **214**, 159–166.

Hong, Y., Saunders, K., Hartley, M.R., and Stanley, J. (1996). Resistance to geminivirus infection by virus-induced expression of dianthin in transgenic plants. *Virology* **220**, 119–127.

Hooft van Huijsduijnen, R.A.M., van Loon, L.C. and Bol, J.F. (1986). cDNA cloning of six mRNAs induced by TMV infection of tobacco and a characterization of their translation products. *EMBO J.* **5**, 2057–2061.

Horikoshi, M., Nakayama, M., Yamaoka, N., Furusawa, I. and Shishiyama, J. (1987). Brome mosaic virus coat protein inhibits viral RNA synthesis *in vitro*. *Virology* **158**, 15–19.

Horikoshi, M., Mise, I., Furusawa, I. And Shishiyama, J. (1988). Immunological analysis of brome mosaic virus replicase. *J. Gen. Virol.* **69**, 3081–3087.

Horne, R.W. (1985). The development and application of electron microscopy to the structure of isolated plant viruses. In: J.W. Davies (ed.) *Molecular Plant Virology*, Vol. 1, pp. 1–41. CRC Press, Boca Raton.

Horne, R.W. and Pasquali-Ronchetti, I. (1974). A negative staining-carbon film technique for studying viruses in the electron microscope: 1. Preparative procedures for examining icosahedral and filamentous viruses. *J. Ultrastruct. Res.* **47**, 381–383.

Horne, R.W. and Wildy, P. (1961). Symmetry in virus architecture. *Virology* **15**, 348–373.

Horne, R.W., Harnden, J.M. and Hull, R. (1977). The *in vitro* crystalline formations of turnip rosette virus: 1. Electron microscopy of two- and three-dimensional arrays. *Virology* **82**, 150–162.

Horst, R.K., Langhans, R.W. and Smith, S.H. (1977). Effects of chrysanthemum stunt, chlorotic mottle, aspermy, and mosaic on flowering and rooting of chrysanthemums. *Phytopathology* **67**, 9–14.

Horváth, G.V., Pettkó-Szandtner, A., Nikovics, K. *et al.* (1998). Prediction of functional regions of the maize streak virus replication-associated proteins by protein–protein interaction analysis. *Plant Mol. Biol.* **38**, 699–712.

Horváth, J. (1983). New artificial hosts and non-hosts of plant viruses and their role in the identification and separation of viruses: XVIII. Concluding remarks. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **18**, 121–161.

Horváth, J. (1993). Host plants in diagnosis. In: R.E.F. Matthews (ed.) *Diagnosis of Plant Virus Diseases*, pp. 18–48. CRC Press, Boca Raton, FL.

Hou, Y.-M. and Gilbertson, R.L. (1996). Increased pathogenicity in a pseudorecombinants bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *J. Virol.* **70**, 5430–5436.

Hou, Y.-M., Sanders, R., Ursin, V.M. and Gilbertson, R.L. (2000). Transgenic plants expressing geminivirus movement protein: abnormal phenotypes and delayed infection by tomato mottle virus in transgenic tomatoes expressing bean dwarf virus BV1 or BC1 proteins. *Mol. Plant Microb. Interact.* **13**, 297–308.

Howarth, A.J. and Vandemark, G.J. (1989). Phylogeny of geminiviruses. *J. Gen. Virol.* **70**, 2717–2727.

Howe, G.A. and Ryan, C.A. (1999). Suppressors of systemin signaling identify gene in the tomato wound response pathway. *Genetics* **153**, 1411–1421.

Howell, S.H. (1984). Physical structure and genetic organisation of the genome of maize streak virus (Kenya isolate). *Nucl. Acids Res.* **12**, 7359–7375.

Howell, S.H., Walker, L.L. and Dudley, R.K. (1980). Cloned cauliflower mosaic virus DNA infects turnips (*Brassica rapa*). *Science* **208**, 1265–1267.

Howell, S.H., Walker, L.L. and Walden, R.M. (1981). Rescue of *in vitro* generated mutants of cloned cauliflower mosaic virus genome in infected plants. *Nature (London)* **293**, 483–486.

Howell, W.E. and Mink, G.I. (1971). The relationship between volunteer sugarbeets and occurrence of beet mosaic and beet western yellow viruses in Washington beet fields. *Plant Dis. Rep.* **55**, 676–678.

Howell, W.E. and Mink, G.I. (1988). Natural spread of cherry rugose mosaic disease and two prunus necrotic ringspot virus biotypes in a central Washington sweet cherry orchard. *Plant Dis.* **72**, 636–640.

Hsu, C.H., Sehgal, O.P. and Pickett, E.E. (1976). Stabilizing effect of divalent metal ions on virions of southern bean mosaic virus. *Virology* **69**, 587–595.

Hsu, H.T. (1978). Cell fusion induced by a plant virus. *Virology* **84**, 9–18.

Hsu, H.T. and Black, L.M. (1973). Comparative efficiencies of assays of a plant virus by lesions on leaves and on vector cell monolayers. *Virology* **52**, 284–286.

Hsu, H.T. and Black, L.M. (1974). Multiplication of potato yellow dwarf virus on vector cell monolayers. *Virology* **59**, 331–334.

Hsu, Y.-H. (1984). Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* **142**, 221–225.

Hsu, Y.-H. and Brakke, M.K. (1985). Cell-free translation of soil-borne wheat mosaic virus RNAs. *Virology* **143**, 272–279.

Hsu, Y.-H., Lee, Y.-S., Liu, J.-S. and Lin, N.-S. (1998). Differential interactions of bamboo mosaic potexvirus satellite RNAs, helper virus and host plants. *Mol. Plant Microb. Interact.* **12**, 1207–1213.

Hsu, Y.-H., Annamalai, P., Lin, C.S., Chen, Y.Y., Chang, W.C. and Lin, N.S. (2000). A sensitive method for detecting bamboo mosaic virus (BaMV) and establishment of BsaMV-free meristem-tip cultures. *Plant Pathol.* **49**, 101–107.

Hu, J.S., Wang, M., Sether, D., Xie, W. and Leonhardt, K.W. (1996). Use of polymerase chain reaction (PCR) to study transmission of banana bunchy top virus by the banana aphid (*Pentolonia nigronervosa*). *Ann. Appl. Biol.* **128**, 55–64.

Huang, M. and Zhang, L. (1999). Association of the movement protein of alfalfa mosaic virus with the endoplasmic reticulum and its trafficking in epidermal cells of onion bulb scales. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **12**, 680–690.

Huang, Z., Han, Y. and Howell, S.H. (2000). Formation of surface tubules and fluorescent foci in *Arabidopsis thaliana* protoplasts expressing a fusion between the green fluorescent protein and cauliflower mosaic virus movement protein. *Virology* **271**, 58–64.

Huber, R. Rezelman, G., Hibit, T. and van Kammen, A. (1977). Cowpea mosaic virus infection of protoplasts from Samsun tobacco leaves. *J. Gen. Virol.* **34**, 315–323.

Hugdahl, J.D., Bokros, C.L. and Morejohn, L.C. (1995). End-to-end annealing of plant microtubules by the p86 subunit of eukaryotic initiation factor-(iso)4F. *Plant Cell* **7**, 2129–2138.

Hughes, G., Davies, J.W. and Wood, K.R. (1986). *In vitro* translation of the bipartite genomic RNA of pea early browning virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 2125–2133.

Hughes, J.d'A. and Ollennu, L.A.A. (1994). Mild strain protection of cocoa in Ghana against cocoa swollen shoot virus—a review. *Plant Pathol.* **43,** 442–457.

Hughes, J.d'A. and Thomas, B.J. (1988). The use of protein A-sandwich ELISA as a means for quantifying serological relationships between members of the tobamovirus group. *Ann. Appl. Biol.* **112,** 117–126.

Hughes, R.K., Perbal, M.-C., Maule, A.J. and Hull, R. (1995). Evidence for proteolytic processing of tobacco mosaic virus movement protein in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **5**, 658–665.

Hugouvieux, V., Barber, C.E. and Daniels, M.J. (1998). Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early events in bacterial pathogenesis. *Mol. Plant Microb. Interact.* **11,** 537–543.

Huguenot, C., van den Dobbelsteen, G., de Haan, P. *et al.* (1990). Detection of tomato spotted wilt virus using monoclonal antibodies and riboprobes. *Arch. Virol.* **110**, 47–62.

Huiet, L., Klaassen, V.A., Tsai, J.H. and Falk, B.W. (1991). Nucleotide sequence and RNA hybridization analyses reveal an ambisense coding strategy for maize stripe virus RNA-3. *Virology* **182**, 47–53.

Huiet, L., Tsai, J.H. and Falk, B.W. (1992). Complete sequence of maize stripe virus RNA4 and mapping of its subgenomic RNAs. *J. Gen. Virol.* **73**, 1603–1607.

Huisman, M.J., Sarachu, A.N., Alblas, F. and Bol, J.F. (1985). Alfalfa mosaic virus temperature-sensitive mutants. II. Early functions encoded by RNAs 1 and 2. *Virology* **141**, 23–29.

Huisman, M.J., Sarachu, A.N., Alblas, F. Broxterman, H.J.G., van Vloten-Doting, L. and Bol, J.F. (1986). Alfalfa mosaic temperature sensitive mutants: III. Mutants with a putative defect in cell-to-cell transport. *Virology* **154**, 401–404.

Hull, R. (1964). Spread of groundnut rosette virus by *Aphis craccivora* (Koch). *Nature* **202**, 213–214.

Hull, R. (1965). Virus diseases of sweet peas in England. *Plant Pathol.* **14**, 150–153.

Hull, R. (1968). A virus disease of Hart's tongue fern. *Virology* **35**, 333–335.

Hull, R. (1969). Alfalfa mosaic virus. *Adv. Virus Res.* **15**, 365–433.

Hull, R. (1970a). Studies on alfalfa mosaic virus: IV. An unusual strain. *Virology* **42**, 283–292.

Hull, R. (1970b). Large RNA plant-infecting viruses. In: R.D. Barry and B.W.J. Mahy (eds) *The Biology of Large RNA Viruses*, pp. 153–164. Academic Press, New York.

Hull, R. (1970c). Studies on alfalfa mosaic virus: III. Reversible dissociation and reconstruction studies. *Virology* **40**, 34–47.

Hull, R. (1976a). The structure of tubular viruses. *Adv. Virus Res.* **20**, 1–32.

Hull, R. (1976b). The behavior of salt-labile plant viruses in gradients of cesium sulphate. *Virology* **75**, 18–25.

Hull, R. (1977a). The banding behaviour of the viruses of southern bean mosaic virus group in gradients of caesium sulphate. *Virology* **79**, 50–57.

Hull, R. (1977b). Particle differences related to aphid transmissibility of a plant virus. *J. Gen. Virol.* **34**, 183–187.

Hull, R. (1977c). The stabilization of the particles of turnip rosette virus and of other members of the southern bean mosaic virus group. *Virology* **79**, 58–66.

Hull, R. (1977d). Properties of an aphid-borne virus: pea enation mosaic virus. In: K.F. Harris and K. Maramorosch (eds) *Aphids as Virus Vectors*, pp. 137–162. Academic Press, New York.

Hull, R. (1978). The stabilization of the particles of turnip rosette virus: III. Divalent cations. *Virology* **89**, 418–422.

Hull, R. (1980). Structure of the cauliflower mosaic virus genome. III. Restriction endonuclease mapping of thirty three isolates. *Virology* **100**, 76–90.

Hull, R. (1985). Purification, biophysical and biochemical characterisation of viruses with especial reference to plant viruses. In B.W.J. Mahy (ed.) *Virology: A Practical Approach*, pp. 1–14. IRL Press, Oxford.

Hull, R. (1986). The potential for using dot-blot hydridisation in the detection of plant viruses. In: R.A.C. Jones and L. Torrance (eds) *Developments and Applications in Virus Testing*, Appl. Biol. I, pp. 3–12. Association of Applied Biologists, Wellesbourne.

Hull, R. (1989). The movement of viruses in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **27**, 213–240.

Hull, R. (1990a). Non-conventional resistance to viruses in plants—concepts and risks. In: G.P. Gustafson (ed.) *Proceedings of the 19th Stadler Conference*, pp. 289–303. Plenum Press, New York.

Hull, R. (1990b). Virus resistant plants: potential and risks. *Chemistry and Industry* **17**, 543–546.

Hull, R. (1991a). The movement of viruses within plants. *Semin. Virol.* **2**, 89–95.

Hull, R. (1991b). Introduction: plant viral pathogenesis. *Semin. Virol.* **2**, 79–80.

Hull, R. (1992). Genome organization of retroviruses and retroelements: evolutionary considerations and implications. *Semin. Virol.* **3**, 373–382.

Hull, R. (1993). Nucleic acid hybridization procedures. In: R.E.F. Matthews (ed.) *Diagnosis of Plant Virus Diseases*, pp. 253–272. CRC Press, Boca Raton, FL.

Hull, R. (1994a). Molecular biology of plant virus–vector interactions. *Adv. Dis. Vector Res.* **10**, 361–386.

Hull, R. (1994b). Resistance to plant viruses: obtaining genes by non-conventional approaches. *Euphytica* **75**, 195–205.

Hull, R. (1996). Molecular biology of rice tungro viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**, 275–297.

Hull, R. (1999a). Plant pararetroviruses.– rice tungro bacilliform virus. . In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1292–1296. Academic Press, San Diego.

Hull, R. (1999b). Classification of reverse transcribing elements: a discussion document. *Arch. Virol.* **144**, 209–214.

Hull, R. (2000). Virus-detection—nucleic acid hybridization. In: O.C. Maloy and T.D. Murray (eds) *Encyclopedia of Plant Pathology*, pp. 1092–1095. John Wiley, New York.

Hull, R. and Covey, S.N. (1983a). Characterization of cauliflower mosaic virus DNA forms isolated from infected turnip leaves. *Nucl. Acids Res.* **11**, 1881–1895.

Hull, R. and Covey, S.N. (1983b). Does cauliflower mosaic virus replicate by reverse transcription? *Trends Biochem. Sci.* **8**, 119–121.

Hull, R. and Covey, S.N. (1996). Retroelements: propagation and adaptation. *Virus Genes* **11**, 105–118.

Hull, R. and Davies, J.W. (1992). Approaches to nonconventional control of plant virus diseases. *Crit. Rev. Plant Sci.* **11**, 17–33.

Hull, R. and Donson, J. (1982). Physical mapping of the DNAs of carnation etched ring and figwort mosaic viruses. *J. Gen. Virol.* **60**, 125–134.

Hull, R. and Johnson, M.W. (1968). The precipitation of alfalfa mosaic virus by magnesium. *Virology* **34**, 388–390.

Hull, R. and Lane, L.C. (1973). The unusual nature of the components of a strain of pea enation mosaic virus. *Virology* 55, 1–13.

Hull, R. and Plaskitt, A. (1970). Electron microscopy on the behaviour of two strains of alfalfa mosaic virus in mixed infections. *Virology* **42**, 773–776.

Hull, R. and Plaskitt, A. (1974). The *in vivo* behaviour of broad bean wilt virus and three of its strains. *Intervirology* **2**, 352–359.

Hull, R., Rees, M. and Short, M.N. (1969a). Studies on alfalfa mosaic virus: I. The protein and nucleic acid. *Virology* **37**, 404–415.

Hull, R., Hills, G.J. and Markham, R. (1969b). Studies on alfalfa mosaic virus: II. The structure of the virus components. *Virology* **37**, 416–428.

Hull, R., Hills, G.J. and Plaskitt, A. (1970). The *in vivo* behaviour of twenty-four strains of alfalfa mosaic virus. *Virology* **42**, 753–772.

Hull, R., Shepherd, R.J. and Harvey, J.D. (1976). Cauliflower mosaic virus: an improved purification procedure and some properties of the virus particles. *J. Gen. Virol.* **31**, 93–100.

Hull, R., Sadler, J. and Longstaff, M. (1986). The sequence of carnation etched ring virus DNA: comparison with cauliflower mosaic virus and retroviruses. *EMBO J.* **5**, 3083–3090.

Hull, R., Covey, S.N. and Maule, A.J. (1987). Structure and replication of caulimovirus genomes. *J. Cell Sci., Suppl.* 7, 213–229.

Hull, R., Brown, F. and Payne, C. (1989). *Virology: Directory and Dictionary of Animal Bacterial and Plant Viruses*. Macmillan, London.

Hull, R.., Milne, R.G. and van Regenmortel, M.H.V. (1991). A list of proposed standard acronyms for plant viruses and viroids. *Arch. Virol.* **120**, 151–164.

Hull, R., Covey, S.N. and Dale, P. (2000a). Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. *Microb. Ecol. Health and Dis.* **12**, 1–5

Hull, R., Lockhart, B. and Harper, G. (2000b). Viral sequences integrated into plant genomes. *Trends Plant Sci.* **5**, 362–365.

Hunt, R.E., Nault, L.R. and Gingery, R.E. (1988). Evidence for infectivity of maize chlorotic dwarf virus and for a helper component in its leafhopper transmission. *Phytopathology* **78**, 499–504.

Hunter, T., Jackson, R. and Zimmern, D. (1983). Multiple proteins and subgenomic mRNAs may be derived from a single open reading frame on tobacco mosaic virus RNA. *Nucl. Acids Res.* **11**, 801–821.

Hunter, W.B., Ullman, D.E. and Moore, A. (1994). Electronic monitoring: Characterizing the feeding behavior of western flower thrips (Thysanoptera: Thripae). In: M.M. Ellsbury, E.A. Backus and D.E. Ullman (eds) *History, Development and Application of AC Electronic Feeding Monitors*, pp. 73–85. Entomological Society of America, Lanham, Maryland.

Hunter, W.B., Hiebert, E., Webb, E., Tsai, J.H. and Polston, J.E. (1998). Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyroididae). *Plant Dis.* **82**, 1147–1151.

Huntley, C.C. and Hall, T.C. (1996). Interference with brome mosaic virus replication in transgenic rice. *Mol. Plant Microb. Interact.* **9**, 164–170.

Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A. *et al.* (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* **246**, 1275–1281.

Huss, B., Muller, S., Sommermeyer, G., Walter, B. and van Regenmortel, M.H.V. (1987). Grapevine fanleaf virus monoclonal antibodies: their use to distinguish different isolates. *J. Phytopathol.* **119**, 358–370.

Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M. *et al.* (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 5879–5883.

Hutchins, C.J., Keese, P., Visvader, J.E., Rathjen, P.D., McInnes, J.L. and Symons, R.H. (1985). Comparison of multimeric plus and minus forms of viroids and virusoids. *Plant Mol. Biol.* **4**, 293–304.

Hutchins, C.J., Rathgen, P.D., Forster, A.C. and Symons, R.H. (1986). Self-cleavage of plus and minus transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucl. Acids Res.* **14**, 3627–3640.

Huxley, H.E. and Zubay, G. (1960). The structure of the protein shell of turnip yellow mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **2**, 189–196.

Hyman, B.C. (1996). Molecular systematic and population biology of phytonematodes: some unifying principles. *Fund. Appl. Nematol.* **19**, 309–313.

Iizuka, N., Chen, C., Yang, Q., Johannes, G. and Sarnow, P. (1995). Cap-independent translation and internal initiation of translation in eukaryotic cellular mRNA molecules. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **203**, 155–177.

Ikegami, M. and Francki, R.I.B. (1973). Presence of antibodies to double-stranded RNA in sera of rabbits immunized with rice dwarf and maize rough dwarf viruses. *Virology* **56**, 404–406.

Ikegami, M. and Francki, R.I.B. (1975). Some properties of RNA from Fiji disease subviral particles. *Virology* **64**, 464–470.

Inglesias, V.A. and Meins, F. (2000). Movement of plant viruses is delayed in a β-1,3-gluconase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *Plant J.* **21**, 157–166.

Innes, R.W. (1998). Genetic dissection of *R* gene signal transduction pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 229–304.

Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego.

Inoue, H. and Timmins, P.A. (1985). The structure of rice dwarf virus determined by small-angle neutron scattering measurements. *Virology* **147**, 214–216.

Irvine, R.F. and Osborne, D.J. (1973). The effect of ethylene on [1B^{14}C] glycerol incorporation into phospholipids of etiolated pea stems. *Biochem. J.* **136**, 1133–1135.

Irwin, M.E. (1999). Implications of movement in developing and deploying integrated pest management strategies. *Agric. Forest Meteorol.* **97**, 235–248.

Irwin, M.E. and Nault, L.R. (1996). Virus/vector control. In: G.J. Persley (ed.) *Biotechnology and Integrated Pest Management*, pp. 304–322. CAB International, London.

Irwin, M.E. and Ruesink, W.G. (1986). Vector intensity: a product of propensity and activity. In: G.D. McClean, R.G. Garrett and W.G. Ruesink (eds) *Plant Virus Epidemics*, pp. 13–33. Academic Press, Orlando, FL.

Irwin, M.E. and Thresh, J.M. (1990). Epidemiology of barley yellow dwarf: a study in ecological complexity. *Annu. Rev Phytopathol.* **28**, 393–424.

Ishihama, A. and Barbier, P. (1994). Molecular anatomy of viral RNA-directed RNA polymerases. *Arch. Virol.* **134**, 235–258.

Ishiie, T., Doi, Y., Yora, K. and Asuyama, H. (1967). Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* **33**, 267–275.

Ishikawa, M., Meshi, T., Ohno, T. *et al.* (1984). A revised replication cycle for viroids: the role of longer than unit length RNA in viroid replication. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 421–428.

Ishikawa, M., Meshi, T., Motoyoshi, F., Takamatsu, N. and Okada, Y. (1986). *In vitro* mutagenesis of the putative replicase genes of tobacco mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* **14**, 8291–8305.

Ishikawa, M., Meshi, T., Watanabe, Y. and Okada, Y. (1988). Replication of chimeric tobacco mosaic viruses which carry heterologous combinations of replicase genes and 3′ noncoding regions. *Virology* **164**, 290–293.

Ishikawa, M., Meshi, T., Ohno, T. and Okada, Y. (1991a). Specific cessation of minus-strand RNA accumulation at an early stage of tobacco mosaic virus infection. *J. Virol.* **65**, 861–868.

Ishikawa, M., Kroner, P., Ahlquist, P. and Meshi, T. (1991b). Biological activities of hybrid RNAs generated by 3′-end exchanges between tobacco mosaic and brome mosaic viruses. *J. Virol.* **65**, 3451–3459.

Ishikawa, M., Obata, F., Kumagai, T. and Ohno, T. (1991c). Isolation of mutants of *Arabidopsis thaliana* in which accumulation of tobacco mosaic virus coat protein is reduced to low levels. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 33–38.

Ishikawa, M., Naito, S and Ohno, T. (1993). Effects of the *tom1* mutation of *Arabidopsis thaliana* on the multiplication of tobacco mosaic virus RNA in protoplasts. *J. Virol.* **67**, 5328–5338.

Ishikawa, M., Janda, M., Krol, M.A. and Ahlquist, P. (1997a). In vivo DNA expression of functional brome mosaic virus RNA replicons in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* **71**, 7781–7790.

Ishikawa, M., Diez, J., Restrepo-Hartwig, M. and Ahlquist, P. (1997b). Yeast mutations in multiple complementation groups inhibit brome mosaic virus RNA replication and transcription and perturb regulated expression of the viral polymerase-like gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 13810–13815.

Ishikawa, M., Janda, M. and Ahlquist, P. (2000). The 3a cell-to-cell movement gene is dispensable for cell-to-cell transmission of brome mosaic virus RNA replicons in yeast but retained over $10^{4.5}$-fold amplification. *J. Gen. Virol.* **81**, 2307–2311.

Ismail, I.D. and Milner, J.J. (1988). Isolation of defective interfering particles of Sonchus yellow net virus from chronically infected plants. *J. Gen. Virol.* **69**, 999–1006.

Ismail, I.D., Hamilton, I.D., Robertson, E. and Milner, J.J. (1987). Movement and intracellular location of Sonchus yellow net virus within infected *Nicotiana edwardsonii*. *J. Gen. Virol.* **68**, 2429–2438.

Isnard, M., Granier, M., Frutos, R., Reynaud, B. and Peterschmidtt, M. (1998). Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *J. Gen. Virol.* **79**, 3091–3099.

Itaya, A., Hickman, H., Bao, Y., Nelson, R. and Ding, B. (1997). Cell-to-cell trafficking of cucumber mosaic virus movement protein:green fluorescent protein fusion produced by biolistic gene bombardment in tobacco. *Plant J.* **12**, 1223–1230.

Itaya, A., Woo, Y.-M., Matsuta, C., Bao, Y., Nelson, R. and Ding, B. (1998). Development regulation of intercellular protein trafficking through plasmodesmata in tobacco leaf epidermis. *Plant Physiol.* **118**, 373–385

Ivanov, P.A., Karpova, O.V., Skulachev, M.V., Tomashevskaya, O.L., Rodionova, N.P., Dorokhov, Yu.L. and Atabekov, J.G. (1997). A tobamovirus genome that contains an internal ribosome entry site functional *in vitro*. *Virology* **232**, 32–43.

Iwanowski, D. (1892). Ueber die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *Bull. Acad. Imp. Sci. St.-Petersbourg [N.W.]* **3**, 65–70.

Izaguirre-Mayoral, M.L., de Uzcategui, R.C. and Carballo, O. (1993). Crassulacean acid metabolism in two species of orchids infected by tobacco mosaic virus-orchid strain and/or cymbidium mosaic virus. *J. Phytopathol.* **137**, 272–282.

Izaguirre-Mayoral, M.L., Carballo, O., Demallorca, M.S., Marys, E. and Gil, F. (1994). Symbiotic nitrogen-fixation and physiological performance of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants as affected by *Rhizobium*-inoculum position and bean rugose mosaic virus infection. *J. Exp. Bot.* **45**, 373–383.

Jacks, T., Madhani, H.D., Masiarz, F.R. and Varmus, H.E. (1988). Signals for ribosomal frameshifting in Rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell* **55**, 447–458.

Jackson, A.O. (1978). Partial characterization of the structural proteins of sonchus yellow net virus. *Virology* **87**, 172–181.

Jackson, A.O., Mitchell, D.M. and Siegel, A. (1971). Replication of tobacco mosaic virus: I. Isolation and characterization of double-stranded forms of ribonucleic acid. *Virology* **45**, 182–191.

Jackson, A.O., Zaitlin, M., Siegel, A. and Francki, R.I.B. (1972). Replication of tobacco mosaic virus: III. Viral RNA metabolism in separated leaf cells. *Virology* **48**, 655–665.

Jackson, A.O., Dawson, J.R.O., Covey, S.N. *et al.* (1983). Sequence relations and coding properties of a subgenomic RNA isolated from barley stripe mosaic virus. *Virology* **127**, 37–44.

Jackson, A.O., Francki, R.I.B. and Zuidema, D. (1987). Biology structure and replication of plant rhabdoviruses. In: R.R. Wagner (ed.) *The Rhabdoviruses*, pp. 427–508. Plenum, New York.

Jackson, A.O., Goodin, M., Moreno, I., Johnson, J. and Lawrence, D.M. (1999). Rhabdoviruses (*Rhabdoviridae*): plant rhabdoviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, pp. 1531–1541. Academic Press, San Diego.

Jacobi, V., Castello, J.D. and Flachmann, M. (1992). Isolation of tomato mosaic virus from red spruce. *Plant Dis.* **76**, 518–522.

Jacobsen, B.J. (1997). Role of plant pathology in integrated pest management. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 373–391.

Jacquemond, M. (1982). Phenomena of interferences between the two types of satellite RNA of cucumber mosaic virus. Protection of tomato plants against lethal necrosis. *C. R. Seances Acad. Sci. Ser. 3* **294**, 991–994.

Jacquemond, M. and Tepfer, M. (1998). Breeding for resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 94–120. APS Press, St. Paul, MN.

Jacquemond, M., Amselem, J. and Tepfer, M. (1988). A gene coding for a monomeric form of cucumber mosaic virus satellite RNA confers tolerance to CMV. *Mol. Plant Microbe Interact.* **1**, 311–316.

Jacquet, C., Delecolle, B., Raccah B., Lecoq, H., Dunez, J. and Ravelonandro, M. (1998). Use of modified plum pox virus coat protein genes developed to limit heteroencapsidation-associated risks in transgenic plants. *J. Gen. Virol.* **79**, 1509–1517.

Jacrot, B. (1975). Studies on the assembly of a spherical plant virus: II. The mechanism of protein aggregation and virus swelling. *J. Mol. Biol.* **95**, 433–446.

Jacrot, B., Pfeiffer, P. and Witz, J. (1976). The structure of a spherical plant virus (bromegrass mosaic virus) established by neutron diffraction. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **276**, 109–112.

Jacrot, B., Chauvin, C. and Witz, J. (1977). Comparative neutron small-angle scattering study of small spherical RNA viruses. *Nature (London)* **266**, 417–421.

Jadot, R. and Roland, G. (1971). Observations sur les deplacements des aphides à partir des plantes adventices marquées dans un champ de betteraves. *Meded. Fac. Landbouwwet., Rijksuniv. Gent* **36**, 940–944.

Jaegle, M. and van Regenmortel, M.H.V. (1985). Use of ELISA for measuring the extent of serological cross-reactivity between plant viruses. *J. Virol. Methods* **11**, 189–198.

Jaegle, M., Wellink, J. and Goldbach, R. (1987). The genome-linked protein of cowpea mosaic virus is bound to the 5– terminus of virus RNA by a phosphodiester linkage to serine. *J. Gen. Virol.* **68**, 627–632.

Jaegle, M., Briand, J.P., Burckard, J. and van Regenmortel, M.H.V. (1988). Accessibility of three continuous epitopes in tomato bushy stunt virus. *Ann. Inst. Pasteur Virol.* **139**, 39–50.

Jaenicke, R. and Lauffer, M.A. (1969). Determination of hydration and partial specific volume of proteins with the spring balance. *Biochemistry* **8**, 3077–3082.

Jagadish, M.N., Ward, C.W., Gough, K.H., Tulloch, P.A., Whittaker, L.A. and Shukla, D.D. (1991). Expression of potyvirus coat protein in *Escherichia coli* and yeast and its assembly into virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **72**, 1543–1550.

Jagadish, M.N., Huang, D.X. and Ward, C.W. (1993). Site-directed mutagenesis of a potyvirus coat protein and its assembly in *Escherischia coli*. *J. Gen. Virol.* **74**, 893–896.

Jagadish, M.N., Edwards, S.J., Hayden, M.B., Grusovin, J., Vandenberg, K., Schoofs, P., Hamilton, R.V., Shukla, D.D., Kalins, H., McNamara, M., Haynes, J., Nisbet, I.T., Ward, C.W. and Pye, D. (1996). Chimeric potyvirus-like particles as vaccine carriers. *Intervirology* **39**, 85–92.

Jagus, R. (1987a). Translation in cell-free systems. In: S.L. Berger and A.R. Kimmel (eds) *Methods in Enzymology*, Vol. 152, pp. 267–296. Academic Press, San Diego.

Jagus, R. (1987b). Characterisation of *in vitro* translation products. In: S.L. Berger and A.R. Kimmel (eds) *Methods in Enzymology*, Vol. 152, pp. 296–304. Academic Press, San Diego.

Jain, R.K., Pappu, S.S., Pappu, H.R., Culbreath, A.K. and Todd, J.W. (1998). Molecular diagnosis of tomato spotted wilt tospovirus infection of peanut and other field and greenhouse crops. *Plant Dis.* **82**, 900–904.

Jakab, G., Kiss, T. and Solymosy, F. (1986). Viroid pathogenicity and pre-rRNA processing: a model amenable to experimental testing. *Biochim. Biophys. Acta* **868**, 190–197.

Jakowitsch, J., Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, M.A. and Matzke, A.J.M. (1999). Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 13241–13246.

James, W.C. (1974). Assessment of plant diseases and losses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **12**, 27–48.

Jan, F.-J., Fagoaga, C., Pang, S.-Z. and Gonsalves, D. (2000a). A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *J. Gen. Virol.* **81**, 2103–2109.

Jan, F.-J., Pang, S.-Z., Tricoli, D.M. and Gonsalves, D. (2000b). Evidence for resistance in squash mosaic comovirus coat protein-transgenic plants is affected by developmental stage and enhanced by combination of transgenes from different lines. *J. Gen. Virol.* **81**, 2299–2306.

Janda, M. and Ahlquist, P. (1993). RNA-dependent replication, transcription and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*. *Cell* **72**, 961–970.

Janda, M. and Ahlquist, P. (1998). Brome mosaic virus RNA replication protein 1a dramatically increases *in vivo* stability but not translation of viral genomic RNA3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 2227–2232.

Janda, M., French, R. and Ahlquist, P. (1987). High efficiency T7 polymerase synthesis of infectious RNA from cloned brome mosaic virus cDNA and effects of 5′ extensions of transcript infectivity. *Virology* **158**, 259–262.

Janssen, J.A.M., Tjallingii, W.F. and van Lenteren, J.C. (1989). Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. *Entomol. Exp. Appl.* **52**, 69–81.

Jardetzky, O., Akasaka, K., Vogel, D., Morris, S. and Holmes, K.C. (1978). Unusual segmental flexibility in a region of tobacco mosaic virus coat protein. *Nature (London)* **273**, 564–566.

Jaspars, E.M.J. (1985). Interaction of alfalfa mosaic virus nucleic acid and protein. In: J.W. Davies (ed.) *Plant Molecular Biology*, Vol. 1, pp. 155–221. CRC Press, Boca Raton, FL.

Jaspars, E.M.J. (1998). A core promoter hairpin is essential for subgenomic RNA synthesis in alfalfa mosaic alfamovirus and is conserved in other *Bromoviridae*. *Virus Genes* **17**, 233–242.

Jedlinski, H. (1964). Initial infection processes by certain mechanically transmitted plant viruses. *Virology* **22**, 331–341.

Jeger, M.J. and Chan, M.S. (1995). Theoretical aspects of epidemics—uses of analytical models to make strategic management decisions. *Can. J. Plant Pathol.* **17**, 109–114.

Jeger, M.J., van den Bosch, F., Madden, L.V. and Holt, J. (1998). A model for analyzing plant–virus transmission characteristics and the epidemic development. *J. Math. Appl. Med. Biol.* **15**, 1–18.

Jelkmann, W. (1994). Nucleotide sequence of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex- and carlaviruses. *J. Gen. Virol.* **75**, 1535–1542.

Jelkmann, W., Maiss, E. and Martin, R.R. (1992). The nucleotide sequence and genome organization of strawberry mild yellow edge-associated potexvirus. *J. Gen. Virol.* **73**, 475–479.

Jelkmann, W., Fetchner, B. and Agronovsky, A.A. (1997). Complete genome structure and phylogenetic analysis of little cherry virus, a mealybug-transmissible closterovirus. *J. Gen. Virol.* **78**, 2067–2071.

Jeng, T.-W., Crowther, R.A., Stubbs, G. and Chiu, W. (1989). Visualization of alpha-helices in tobacco mosaic virus by cryo-protection microscopy. *J. Mol. Biol.* **205**, 251–257.

Jennings, D.L. and Jones, A.T. (1986). Immunity from raspberry vein chlorosis virus in raspberry and its potential for control of the virus through plant breeding. *Ann. Appl. Biol.* **108**, 417–422.

Jenns, A.E. and Kuc, J. (1980). Characteristics of anthracnose resistance induced by localized infection of cucumber with tobacco necrosis virus. *Physiol. Plant Pathol.* **17**, 81–91.

Jensen, S.G. (1973). Systemic movement of barley yellow dwarf virus in small grains. *Phytopathology* **63**, 854–856.

Jobling, S.A. and Gehrke, L. (1987). Enhanced translation of chimeric messenger RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence. *Nature (London)* **325**, 622–625.

Jockusch, H. (1964). *In vivo*- and *in vitro*-Verhalten temperature sensitiver Mutanten des tabakmosaikvirus. *Z. Vererbungsl.* **95**, 379–382.

Joelson, T., Åkerblom, L., Oxelfelt, P., Strandberg, B., Tomenius, K. and Morris, T.J. (1997). Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *J. Gen. Virol.* **78**, 1213–1217.

Johansen, E., Edwards, M.C. and Hampton, R.O. (1994). Seed transmission of viruses: current perspectives. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 363–386.

Johansen, E., Dougherty, W.G., Keller, K.E., Wang, D. and Hampton, R.O. (1996). Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seedborne mosaic virus in *Pisum sativum*. *J. Gen. Virol.* **77**, 3149–3154.

John, V.T. (1965). A micro-immuno-osmophoretic technique for assay of tobacco mosaic virus. *Virology* **27**, 121–123.

John, V.T. and Weintraub, M. (1966). Symptoms resembling virus infection induced by high temperature in *Nicotiana glutinosa*. *Phytopathology* **56**, 502–506.

Johnson, C.S. and Main, C.E. (1983). Yield/quality tradeoffs of tobacco mosaic virus-resistant tobacco cultivars in relation to disease management. *Plant Dis.* **67**, 886–890.

Johnson, D.A., Gautsch, J.W., Sportsman, J.R. and Elder, J.H. (1984). Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Tech.* **1**, 3–8.

Johnson, E.M. and Valleau, W.D. (1946). Field strains of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* **36**, 112–116.

Johnson, J. (1937). Factors relating to the control of ordinary tobacco mosaic virus. *J. Agr. Res.* **54**, 239–273.

Johnson, J. (1942). Translations of: 1. Concerning the mosaic disease of tobacco: Adolf Mayer; 2. Concerning the mosaic disease of the tobacco plant: Dmitrii Ivanowski; 3. Concerning a contagium vivum fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves: Martinus W. Beijerinck; 4. On the etiology of infectious variagation: Erwin Baur. *Phytopathology Classics Number 7*.

Johnson, J. (1947). Virus attenuation and mutation. *Phytopathology* **37**, 12.

Johnson, J. and Hoggan, I.A. (1935). A descriptive key for plant viruses. *Phytopathology* **25**, 328–343.

Johnson, J. and Ogden, W.B. (1929). The overwintering of tobacco mosaic virus. *Wis. Agric. Exp. Stn. Bull.* **95**, 1–25.

Johnson, J., Lin, T. and Lomonossoff, G. (1997). Presentation of heterologous peptides on plant viruses: Genetics, structure and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 67–86.

Johnson, J.E. and Speir, J.A. (1997). Quasi-equivalent viruses: a paradigm for protein assemblies. *J. Mol. Biol.* **269**, 665–675.

Johnson, J.E. and Spier, J.A. (1999). Principles of virus structure. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, pp. 1946–1956. Academic Press, San Diego.

Johnson, M.W. (1964). The binding of metal ions by turnip yellow mosaic virus. *Virology* **24**, 26–35.

Johnson, M.W. and Markham, R. (1962). Nature of the polyamine in plant viruses. *Virology* **17**, 276–281.

Johnston, J.C. and Rochon, D.M. (1995). Deletion analysis of the promoter for cucumber necrosis virus 0.9-kb subgenomic RNA. *Virology* **214**, 100–109.

Johnstone, G.R., Koen, T.B. and Conley, H.L. (1982). Incidence of yellows in sugar beet as affected by variation in plant density and arrangement. *Bull. Entomol. Res.* **72**, 289–294.

Johnstone, G.R., Ashby, J.W., Gibbs, A.J., Duffus, J.E., Thottappilly, G. and Fletcher, J.D. (1984). The host ranges, classification and identification of eight persistent aphid-transmitted viruses causing disease in legumes. *Neth. J. Plant Pathol.* **90**, 225–245.

Joklik, W.K. (1999). Reoviruses (*Reoviridae*): molecular biology. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1464–1471. Academic Press, San Diego.

Jonard, G., Richards, K.E., Guilley, H. and Hirth, L. (1977). Sequence from the assembly nucleation region of TMV RNA. *Cell* **11**, 483–493.

Jones, A.T. (1987). Control of virus infection in crop plants through vector resistance: a review of achievements, prospects and problems. *Ann. Appl. Biol.* **111**, 745–772.

Jones, A.T. (1998). Control of virus infection in crops through breeding plants for vector resistance. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 41–55. APS Press, St. Paul, MN.

Jones, A.T. and Mayo, M.A. (1984). Satellite nature of the viroid-like RNA2 of *Solanum nodiflorum* mottle virus and the ability of other plant viruses to support the replication of viroid-like RNA molecules. *J. Gen. Virol.* **65**, 1713–1721.

Jones, A.T. and Mitchell, M.J. (1986). Propagation of black raspberry necrosis virus (BRNV) in mixed culture with *Solanum nodiflorum* mottle virus and the production and use of BRNV antiserum. *Ann. Appl. Biol.* **109**, 323–336.

Jones, A.T. and Mitchell, M.J. (1987). Oxidising activity in root extracts from plants inoculated with virus or buffer that interferes with ELISA when using the substrate 3,3′, 5,5′ tetramethyl-benzidine. *Ann. Appl. Biol.* **111**, 359–364.

Jones, A.T., Mayo, M.A. and Duncan, G.H. (1983). Satellite-like properties of small circular RNA molecules in particles of lucerne transient streak virus. *J. Gen. Virol.* **64**, 1167–1173.

Jones, G.E. and Dawson, W.O. (1978). Stability of mutations conferring temperature sensitivity on tobacco mosaic virus. *Intervirology* **9**, 149–155.

Jones, I.M. and Reichmann, M.E. (1973). The proteins synthesized in tobacco leaves infected with tobacco necrosis virus and satellite tobacco necrosis virus. *Virology* **52**, 49–56.

Jones, L., Hamilton, A.J., Voinnet, O., Thomas, C.L., Maule, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999). RNA–DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* **11**, 2291–2301.

Jones, M.C., Gough, K., Dasgupta, I. *et al.* (1991). Rice tungro disease is caused by an RNA and a DNA virus. *J. Gen. Virol.* **72**, 757–761.

Jones, R.A.C. (1975). Systemic movement of potato mop-top virus in tobacco may occur through the xylem. *Phytopathol. Z.* **82**, 352–355.

Jones, R.A.C. (1982). Breakdown of potato virus X resistance gene Nx: selection of a group four strain from strain group three. *Plant Pathol.* **31**, 325–331.

Jones, R.A.C. (1985). Further studies on resistance-breaking strains of potato virus X. *Plant Pathol.* **34**, 182–189.

Jones, R.A.C. and Fribourg, C.E. (1977). Beetle, contact and potato true seed transmission of Andean potato latent virus. *Ann. Appl. Biol.* **86**, 123–128.

Jones, R.A.C. and Harrison, B.D. (1972). Ecological studies on potato mop-top virus in Scotland. *Ann. Appl. Biol.* **71**, 47–57.

Jones, R.W., Jackson, A.O. and Morris, T.J. (1990). Defective-interfering RNAs and elevated temperatures inhibit replication of tomato bushy stunt virus in inoculated protoplasts. *Virology* **176**, 539–545.

Jones, T.A. and Liljås, L. (1984). Structure of satellite tobacco necrosis virus after crystallographic refinement at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **177**, 735–767.

Joshi, S., Pleij, C.W.A., Haenni, A.-L., Chapeville, F. and Bosch, L. (1983). Properties of the tobacco mosaic virus intermediate length RNA2 and its translocation. *Virology* **127**, 100–111.

Joubert, J.J., Hahn, J.S., von Wechmar, M.B. and van Regenmortel, M.H.V. (1974). Purification and properties of tomato spotted wilt virus. *Virology* **57**, 11–19.

Joyce, C.M. and Steitz, T.A. (1994). Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 777–822.

Juckes, I.R.M. (1971). Fractionation of proteins and viruses with polyethylene glycol. *Biochim. Biophys. Acta* **229**, 535–546.

Jupin, I., Quillet, L., Ziegler-Graff, V., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G. (1988). *In vitro* translation of natural and synthetic beet necrotic yellow vein virus RNA1. *J. Gen. Virol.* **69**, 2359–2367.

Jurík, M., Mucha, V. and Valenta, V. (1980). Intraspecies variability in transmission efficiency of stylet-borne viruses by the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*). *Acta Virol.* **24**, 351–357.

Juszczuk, M., Paczkowski, E., Sadowy, E., Zagórski, W. and Hulanicka, D.M. (2000). Effect of genomic and subgenomic leader sequences of potato leafroll virus on gene expression. *FEBS Lett.* **484**, 33–36.

Kachroo, P., Yoshioka, K., Shah, J., Dooner, H. and Klessig, D.F. (2000). Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is affected by two host genes, is salicylic acid dependent but *NRP1*, ethylene and jasmonate independent. *Plant Cell* **12**, 677–690.

Kadarei, G. and Haenni, A.-L. (1997). Virus-encoded RNA helicases. *J. Virol.* **71**, 2583–2590.

Kahn, R.P. (1976). Aseptic plantlet culture to improve the phytosanitary aspects of plant introduction for asparagus. *Plant Dis. Rep.* **60**, 459–461.

Kahn, R.P. (1989). *Plant Protection and Quarantine*, Vols 1–3. CRC Press, Boca Raton, FL.

Kahn, R.P. and Monroe, R.L. (1970). Viruses isolated from arborescent *Datura* species from Bolivia, Ecuador and Columbia. *Plant Dis. Rep.* **54**, 675–677.

Kahn, T.W., Lapidot, M., Heinlein, M. *et al.* (1998). Domains of the TMV movement protein involved in subcellular localization. *Plant J.* **15**, 15–25.

Kaiser, W.J. and Danesh, D. (1971). Etiology of virus-induced wilt of *Cicer arietinum*. *Phytopathology* **61**, 453–457.

Kakutani, T., Hayano, Y., Hayashi, T. and Minobe, Y. (1991). Ambisense segment 3 of rice stripe virus: the first instance of a virus containing two ambisense segments. *J. Gen. Virol.* **72**, 465–468.

Kamei, T., Goto, T. and Matsui, C. (1969). Turnip virus multiplication in leaves infected with cauliflower mosaic virus. *Phytopathology* **59**, 1795–1797.

Kamer, G. and Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucl. Acids Res.* **12**, 7269–7282.

Kammann, M., Schalk, H.-J., Matzeit, V., Schaefer, S., Schell, J. and Gronenborn, B. (1991). DNA replication of wheat dwarf virus, a geminivirus, requires two *cis*-acting signals. *Virology* **184**, 786–790.

Kan, J.H., Andree, P.-J., Kouijzer, L.C. and Mellema, J.E. (1982). Proton-magnetic-resonance studies on the coat protein of alfalfa mosaic virus. *Eur. J. Biochem.* **126**, 29–33.

Kan, J.H., Cremers, A.F.M., Haasnoot, C.A.G. and Hilbers, C.W. (1987). The dynamical structure of the RNA of alfalfa mosaic virus studied by ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Eur. J. Biochem.* **168**, 635–639.

Kaniewski, W. and Lawson, C. (1998). Coat protein and replicase-mediated resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 65–78. APS Press, St. Paul, MN.

Kaniewski, W.K. and Thomas, P.E. (1993). Field testing of virus resistant transgenic plants. *Semin Virol.* **4**, 389–396.

Kanyuka, K.V., Vishnichenko, V.K., Levay, K.E. *et al.* (1992). Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 3'-proximal cistrons. *J. Gen. Virol.* **73**, 2553–2560.

Kao, C.C. and Ahlquist, P. (1992). Identification of the domains required for direct interaction of the helicase-like and polymerase-like RNA replication proteins of brome mosaic virus. *J. Virol.* **66**, 7293–7302.

Kao, C.C., Quadt, R., Hershberger, R.P. and Ahlquist, P. (1992). Brome mosaic virus RNA replication proteins 1a and 2a form a complex *in vitro*. *J. Virol.* **66**, 6322–6329.

Kaper, J.M. (1972). Experimental analysis of the stabilising interactions of simple RNA viruses. *Proc. FEBS Meet.* **27**, 19–41.

Kaper, J.M. (1975). The chemical basis of virus structure, dissociation and reassembly. *Front. Biol.* **39**, 1–485.

Kaper, J.M. and Collmer, C.W. (1988). Modulation of viral plant diseases by secondary RNA agents. In: E. Domingo, J.J. Holland and P. Ahlquist (eds) *RNA Genetics*, Vol. 3, pp. 171–193. CRC Press, Boca Raton, FL.

Kaper, J.M. and Diaz-Ruiz, J.R. (1977). Molecular weights of the double-stranded RNAs of cucumber mosaic virus strain S and its associated RNA5. *Virology* **80**, 214–217.

Kaper, J.M. and Tousignant, M.E. (1977). Cucumber mosaic virus-associated RNA5. I. Role of host plant and helper strain in determining amount of associated RNA5 with virions. *Virology* **80**, 186–195.

Kaper, J.M. and Waterworth, H.E. (1977). Cucumber mosaic virus associated RNA5. Causal agent for tomato necrosis. *Science* **196**, 429–431.

Kaper, J.M., Diener, T.O. and Scott, H.A. (1965). Some physical and chemical properties of cucumber mosaic virus (strain Y) and of its isolated ribonucleic acid. *Virology* **27**, 54–72.

Kaper, J.M., Tousignant, M.E. and Lot, H. (1976). A low-molecular-weight replicating RNA associated with a divided genome plant virus: defective or satellite RNA? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**, 1237–1243.

Kaper, J.M., Tousignant, M.E. and Steen, M.T. (1988a). Cucumber mosaic virus-associated RNA5. XI. Comparison of 14 CARNA5

variants relates ability to induce tomato necrosis to a conserved nucleotide sequence. *Virology* **163**, 284–292.

Kaper, J.M., Tousignant, M.E. and Steger, G. (1988b). Nucleotide sequence predicts circularity and self cleavage of 300-ribonucleotide satellite of arabis mosaic virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 318–325.

Kaper, J.M., Gallitelli, D. and Tousignant, M.E. (1990). Identification of a 334-ribonucleotide viral satellite as principal aetiological agent in a tomato necrosis epidemic. *Res. Virol.* **141**, 81–95.

Kaplan, I.B., Zhang, L. and Palukaitis, P. (1998). Characterization of cucumber mosaic virus: V. Cell-to-cell movement requires capsid protein but not virions. *Virology* **246**, 221–231.

Karasawa, A., Okada, I., Akashi, K. *et al.* (1999). One amino acid change in cucumber mosaic virus RNA polymerase determines virulent/avirulent phenotypes on cowpea. *Phytopathology* **89**, 1186–1192.

Karasev, A.V. (2000). Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**, 293–324.

Karasev, A.V. and Hilf, M.E. (1997). Molecular biology of the citrus tristeza virus. In: P.L. Monette (ed) *Filamentous Viruses of Woody Plants*, pp. 121–131. Research Signpost, Trivandrum.

Karasev, A.V., Kashina, A.S., Gelfand, V.I. and Dolja, V.V. (1992). HSP70-related 65 kDa protein of beet yellows closterovirus is a microtubule-binding protein. *FEBS Lett.* **304**, 12–14.

Karasev, A.V., Boyko, V.P., Nikolaeva, O.V. *et al.* (1995). Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* **208**, 511–520.

Karasev, A.V., Hilf, M.E., Garnsey, S.M. and Dawson, W.O. (1997). Transcriptional strategy of closteroviruses: mapping the 5′ termini of the citrus tristeza virus subgenomic RNAs. *J. Virol.* **71**, 6233–6236.

Karpova, O.V., Tyulkina, L.G., Atabekov, K.J., Rodionova, N.P. and Atabekov, J.G. (1989). Deletion of intercistronic poly(A) tract from brome mosaic virus RNA3 by ribonuclease H and its restoration in progeny of the relegated RNA3. *J. Gen. Virol.* **70**, 2287–2297.

Karrer, E.K., Beachy, R.N. and Holt, C.A. (1998). Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. *Plant Mol. Biol.* **36**, 681–690.

Karyeija, R.F., Kreuze, J.F., Gibson, R.W. and Valkonen, J.P.T. (2000). Synergistic interactions of a potyvirus anmd a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants. *Virology* **269**, 26–36.

Kashiwazaki, S., Minobe, Y., Omura, T. and Hibino, H. (1990). Nucleotide sequence of barley yellow mosaic virus RNA 1: a close evolutionary relationship with potyviruses. *J. Gen. Virol.* **71**, 2781–2790.

Kashiwazaki, S., Minobe, Y. and Hibino, H. (1991). Nucleotide sequence of barley yellow mosaic virus RNA 2. *J. Gen. Virol.* **72**, 995–999.

Kassanis, B. (1939). Intranuclear inclusions in virus-infected plants. *Ann. Appl. Biol.* **26**, 705–709.

Kassanis, B. (1952). Some effects of high temperature on the susceptibility of plants to infection with viruses. *Ann. Appl. Biol.* **39**, 358–369.

Kassanis, B. (1962). Properties and behaviour of a virus depending for its multiplication on another. *J. Gen. Microbiol.* **27**, 477–488.

Kassanis, B. and Bastow, C. (1971). The relative concentration of infective intact virus and RNA of four strains of tobacco mosaic virus as influenced by temperature. *J. Gen. Virol.* **11**, 157–170.

Kassanis, B. and Govier, D.A. (1971). New evidence on the mechanism of aphid transmission of potato C and potato aucuba mosaic viruses. *J. Gen. Virol.* **10**, 99–101.

Kassanis, B. and Macfarlane, I. (1968). The transmission of satellite viruses of tobacco necrosis virus by *Olpidium brassicae*. *J. Gen. Virol.* **3**, 227–232.

Kassanis, B. and Phillips, M.P. (1970). Serological relationship of strains of tobacco necrosis virus and their ability to activate strains of satellite virus. *J. Gen. Virol.* **9**, 119–126.

Kassanis, B. and Varma, A.(1967). The production of virus-free clones of some British potato varieties. *Ann. Appl. Biol.* **59**, 447–450.

Kassanis, B. and White, R.F. (1974). A simplified method of obtaining tobacco protoplasts for infection with tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **24**, 447–452.

Kassanis, B., Vince, D.A. and Woods, R.D. (1970). Light and electron microscopy of cells infected with tobacco necrosis and satellite viruses. *J. Gen. Virol.* **7**, 143–151.

Kassanis, B., White, R.F. and Woods, R.D. (1975). Inhibition of multiplication of tobacco mosaic virus in protoplasts by antibiotics and its prevention by divalent metals. *J. Gen. Virol.* **28**, 185–191.

Kassanis, B., Russell, G.E and White, R.F. (1978). Seed and pollen transmission of beet cryptic virus in sugar beet plants. *Phytopathol. Z.* **91**, 76–79.

Kasschau, K.D and Carrington, J.C. (1998). A counterdefense strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**, 461–470.

Kasteel, D. (1999). Structure, morphogenesis and function of tubular structures induced by cowpea mosaic virus. PhD thesis, University of Wageningen, Netherlands.

Kasteel, D.T.J., Perbal, M.-C., Boyer, J.-C. *et al.* (1996). The movement proteins of cowpea mosaic virus and cauliflower mosaic virus induce tubular structures in plant and insect cells. *J. Gen. Virol.* **77**, 2857–2864.

Kasteel, D.T.J., van der Wel, N.N., Jansen, K.A.L., Goldbach, R.W. and van Lent, J.W.M. (1997). Tubule forming capacity of the movement protein of AlMV and BMV. *J. Gen. Virol.* **78**, 2089–2093.

Katis, N., Carpenter, J.M. and Gibson, R.W. (1986). Interference between potyviruses during aphid transmission. *Plant Pathol.* **35**, 152–157.

Katouzian-Safadi, M. and Berthet-Colominas, C. (1983). Evidence for the presence of a hole in the capsid of turnip yellow mosaic virus after RNA release by freezing and thawing: decapsidation of turnip yellow mosaic virus *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* **137**, 47–55.

Katouzian-Safadi, M. and Haenni, A.-L. (1986). Studies on the phenomenon of turnip yellow mosaic virus RNA release by freezing and thawing. *J. Gen. Virol.* **67**, 557–565.

Katul, L., Maiss, E., Morozov, S.Y. and Vetten, H.J. (1997). Analysis of six DNA components of the faba bean necrotic yellows virus genome and their structural affinity to related plant virus genomes. *Virology* **233**, 247–259.

Katul, L., Timchenko, T., Gronenborn, B. and Vetten, H.J. (1998). Ten distinct circular ssDNA components, four of which encode putative replication associated proteins, are associated with the faba bean necrotic yellows virus genome. *J. Gen. Virol.* **79**, 3101–3109.

Katz, D. and Kohn, A. (1984). Immunoabsorbent electron microscopy for detection of vinises. *Adv. Virus Res.* **29**, 169–194.

Kausche, G.A., Pfankuch, E. and Ruska, A. (1939). Die Sichtbormachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop. *Naturwissenschaften* **27**, 292–299.

Kavanagh, T., Goulden, M., Santa Cruz, S., Chapman, S., Barker, I. and Baulcombe, D. (1992). Molecular analysis of a resistance-breaking strain of potato virus X. *Virology* **189**, 609–617.

Kawakami, S., Padgett, H.S., Hosokawa, D., Okada, Y., Beachy, R.N. and Watanabe, Y. (1999). Phosphorylation and/or presence of serine 37 in the movement protein of tomato mosaic tobamovirus is essential for intracellular localization and stability *in vivo*. *J. Virol.* **73**, 6831–6840.

Kawchuk, L.M., Martin, R.R. and McPherson, J. (1990). Resistance in transgenic potato expressing the potato leafroll virus coat protein gene. *Mol. Plant Microb. Interact.* **3**, 301–307.

Kawchuk, L.M., Martin, R.R. and McPherson, J. (1991). Sense and antisense RNA-mediated resistance to potato leafroll virus in Russet Burbank potato plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **4**, 247–253.

Kay, R., Chan, A., Daly, M. and McPherson, J. (1987). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**, 1299–1302.

Kearney, C.M., Donson, J., Jones, G.E. and Dawson, W.O. (1993). Low level of genetic drift in foreign sequences replicating in an RNA virus in plants. *Virology* **192**, 11–17.

Kearney, C.M., Thomson, M.J. and Roland, K.E. (1999). Genome evolution of tobacco mosaic virus populations during long-term passaging in a diverse range of hosts. *Arch. Virol.* **144**, 1513–1526.

Keeling, J. and Matthews, R.E.F. (1982). Mechanism for release of RNA from turnip yellow mosaic virus at high pH. *Virology* **119**, 214–218.

Keeling, J., Collins, E.R. and Matthews, R.E.F. (1979). Behaviour of turnip yellow mosaic virus nucleoproteins under alkaline conditions. *Virology* **97**, 100–111.

Keese, P. and Gibbs, A. (1992). Origins of genes: 'big band' or continuous creation? *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 9489–9493.

Keese, P. and Symons, R.H. (1985). Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evoluation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **82**, 4582–4586.

Keese, P. and Symons, R.H. (1987). The structure of viroids and virusoids. In: J.S. Semancik (ed.) *Viroids and Viroid-like Pathogens*, pp. 1–47. CRC Press, Boca Raton, FL.

Keese, P., Bruening, G. and Symons, R.H. (1983). Comparative sequence and structure of circular RNAs from two isolates of lucerne transient streak virus. *FEBS Lett.* **159**, 185–190.

Keese, P., Mackenzie, A. and Gibbs, A. (1989). Nucleotide sequence of the genome of an Australian isolate of turnip yellow mosaic tymovirus. *Virology* **172**, 536–546.

Kekuda, R., Sundareshan, S., Karande, A. and Savithri, H.S. (1995). Monoclonal antibodies in the study of architechture of plant viruses. *Curr. Sci.* **68**, 611–617.

Keller, K. E., Johnasen, E., Martin, R.R. and Hampton, R.O. (1998). Potyvirus genome-linked protein (VPg) determines pea seed-borne mosaic virus pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 124–130.

Keller, P., Lüttge, U., Wang, X.-C. and Büttner, G. (1989). Influence of rhizomania disease on gas exchange and water relations of a susceptible and a tolerant sugar beet variety. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**, 379–392.

Kempers R. and van Bel, A.J.E. (1997). Symplastic connections between sieve elements and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* L. have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa. *Planta* **201**, 195–201.

Kendall, T.L. and Lommel, S.A. (1992). Nucleotide sequence of carnation ringspot dianthovirus RNA-2. *J. Gen. Virol.* **73**, 2479–2488.

Kennedy, J.S. (1951). Benefits to aphids from feeding on galled and virus-infected leaves. *Nature (Lond.)* **168**, 825–826.

Kennedy, J.S., Day, M.F. and Eastop, V.F. (1962). *A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses*. Commonwealth Institute of Entomology, London.

Kenten, R.H. and Lockwood, G. (1977). Studies on the possibility of increasing resistance to cocoa swollen-shoot virus by breeding. *Ann. Appl. Biol.* **85**, 71–78.

Kerlan, C., Robert, Y., Perennec, P. and Guillery, E. (1987). Survey of the level of infection by PVY-O and control methods developed in France for potato seed production. *Potato Res.* **30**, 651–667.

Kessler, C. (1993). Nonradioactive labeling methods for nucleic acids. In: L.J. Kricka (ed.) *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, pp. 29–92. Academic Press, San Diego.

Ketellapper, H.J. (1963). Temperature-induced chemical defects in higher plants. *Plants Physiol.* **38**, 175–179.

Ketting, R.F., Haverkamp, T.H.A., van Luenen, H.G.A.M. and Plasterk, R.H.A. (1999). *mut-7* of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner Syndrome helicase and RNaseD. *Cell* **99**, 133–141.

Khan, I.A. and Jones, G.E. (1989). Selection for a specific tobacco mosaic virus variant during bolting of *Nicotiana sylvestris*. *Can. J. Bot.* **67**, 88–94.

Khan, M.A. and Maxwell, D.P. (1977). Use of inclusions in the rapid diagnosis of virus diseases of red clover. *Plant Dis. Rep.* **61**, 679–683.

Khan, M.A. and Mukhopadhyay, S. (1985). Studies on the effect of some alternative cultural methods on the incidence of yellow vein mosaic virus (YVMV) disease of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.). *Indian J. Virol.* **1**, 69–72.

Khan, M.A., Maxwell, D.P. and Maxwell, M.D. (1977). Light microscopic cytochemistry and ultrastructure of red clover vein mosaic virus-induced inclusions. *Virology* **78**, 173–182.

Khandjian, E.W. (1987) Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes *Biotechnology* **5**, 165–167.

Khetarpal, R.K., Bossennec, J.-M., Burghofer, A., Cousin, A. and Maury, Y. (1988). Effect of pea seed-borne mosaic virus on yield of field pea. *Agronomie* **8**, 811–815.

Khetarpal, R.K., Maisonneuve, B., Maury, Y. *et al.* (1998). Breeding for resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 14–32. APS Press, St. Paul, MN.

Kheyr-Pour, A., Gronenborn, B. and Czosnek, H. (1994). Agroinoculation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) overcomes the virus resistance of wild *Lycopersicon* species. *Plant Breeding* **112**, 228–233.

Kiberstis, P.A. and Zimmern, D. (1984). Translational strategy of *Solanum nodiflorum* mottle virus RNA: synthesis of a coat protein precursor *in vitro* and *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* **12**, 933–943.

Kiberstis, P.A., Loesch-Fries, L.S. and Hall, T.C. (1981). Viral protein synthesis in barley protoplasts inoculated with native and fractionated brome mosaic virus RNA. *Virology* **112**, 804–808.

Kiberstis, P.A., Pessi, A., Atherton, E., Jackson, R., Hunter, T. and Zimmern, D. (1983). Analysis of *in vitro* and *in vivo* products of the TMV 30 kDa open reading frame using antisera raised against a synthetic peptide. *FEBS Lett.* **164**, 355–360.

Kiefer, M.C., Daubert, S.D., Schneider, I.R. and Bruening, G. (1982). Multimeric forms of satellite of tobacco ringspot virus RNA. *Virology* **121**, 262–273.

Kiefer, M.C., Owens, R.A. and Diener, T.O. (1983). Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **80**, 6234–6238.

Kiguchi, T., Saito, M. and Tamada, T. (1996). Nucleotide sequence analysis of RNA-5 of five isolates of beet necrotic yellow vein virus and the identity of a deletion mutant. *J. Gen. Virol.* **77**, 575–580.

Kiho, Y., Machida, H. and Oshima, N. (1972). Mechanism determining the host specificity of tobacco mosaic virus: I. Formation of polysomes containing infecting viral genome in various plants. *Jpn J. Microbiol.* **16**, 451–459.

Kikkawa, H., Nagata, T., Matsui, C. and Takebe, I. (1982). Infection of protoplasts from tobacco suspension cultures by tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **63**, 451–456.

Kikkert, M., Van Poelwijk, F., Storms, M. *et al.* (1997). A protoplast system for studying tomato spotted wilt infection. *J. Gen. Virol.* **78**, 1775–1763.

Kikkert, M., Meurs, C., van de Wetering, F. *et al.* (1998). Binding of tomato spotted wilt virus to a 94-kDa thrips protein. *Phytopathology* **88**, 63–69.

Kikuchi, Y., Tye, K., Filipowicz, W., Sänger, H.L. and Gross, H.J. (1982). Circularization of linear viroid RNA via 2′-phosphomonoester, 3′,5′-phosphodiester bonds by a novel type of RNA ligase from wheat germ and *Chlamydomonas*. *Nucl. Acids Res.* **10**, 7521–7529.

Kim, C.-H. and Palukaitis, P. (1997). The plant defense response to cucumber mosaic virus in *Coppea* is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. *EMBO J.* **16**, 4060–4068.

Kim, D.-H., Park, Y.S., Kim, S.S., Lew, J., Nam, H.G. and Choi, K.Y. (1995). Expression, purification and identification of a novel self-cleavage site of the NIa C-terminal 27-kDa protease of turnip mosaic potyvirus C5. *Virology* **213**, 517–525.

Kim, D.-H., Hwang, D.C., Kang, B.H. *et al.* (1996). Effects of internal cleavages and mutations in the C-terminal region of NIa protease of turnip mosaic potyvirus on the catalytic activity. *Virology* **226**, 183–190.

Kim, H.-H. and Lommel, S.A. (1994). Identification and analysis of the site of –1 ribosomal frameshifting in red clover necrotic mosaic virus. *Virology* **200**, 574–582.

Kim, K.-H. and Hemenway, C. (1996). The 5′ nontranslated region of potato virus X RNA affects both genomic and subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* **70**, 5533–5540.

Kim, K.-H. and Hemenway, C. (1997). Mutations that alter a conserved element upstream of the potato virus X triple block and coat protein genes affect subgenomic RNA accumulation *Virology* **232**, 187–197.

Kim, K.-H. and Hemenway, C. (1999).Long-distance RNA–RNA interactions and conserved sequence elements affect potato virus X plus-strand RNA accumulation. *RNA* **5**, 636–645.

Kim, K.S. (1977). An ultrastructural study of inclusions and disease development in plant cells infected by cowpea chlorotic mottle virus. *J. Gen. Virol.* **35**, 535–543.

Kim, K.S., Fulton, J.P. and Scott, H.A. (1974). Osmiophilic globules and myelinic bodies in cells infected with two comoviruses. *J. Gen. Virol.* **25**, 445–452.

Kim, M.-J. and Kao, C. (2001). Factors regulating template switch *in vitro* by viral RNA-dependent RNA polymerases: implications for RNA-RNA recombination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 4972–4977.

Kimble, K.A., Grogan, R.G., Greathead, A.S., Paulus, A.O. and House, J.K. (1975). Development, application and comparison of methods for indexing lettuce seed for mosaic virus in California. *Plant Dis. Rep.* **59**, 461–464.

Kimmins, W.C. and Brown, R.G. (1973) Hypersensitive resistance. The role of cell wall glycoproteins in virus localization. *Can. J. Bot.* **51**, 1923–1926.

Kimura, I. (1986). A study of rice dwarf virus in vector cell monolayers by fluorescent antibody focus counting. *J. Gen. Virol.* **67**, 2119–2124.

Kimura, I. and Black, L.M. (1972). The cell-infecting unit of wound tumor virus. *Virology* **49**, 549–561.

Kimura, I., Minobe, Y. and Omura, T. (1987). Changes in a nucleic acid and a protein component of rice dwarf virus particles associated with an increase in symptom severity. *J. Gen. Virol.* **68**, 3211–3215.

Kimura, M. (1990). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**, 111–120.

King, A.M.Q. (1998). Genetic recombination in positive strand RNA viruses. In: E. Domingo, J.J. Holland and P. Ahlquist (eds) *RNA Genetics*, Vol. II, pp. 149–165. CRC Press, Boca Raton, FL.

King, L. and Leberman, R. (1973). Derivatisation of carboxyl groups of tobacco mosaic virus with cystamine. *Biochim. Biophys. Acta* **322**, 279–293.

King, L.A. and Possee, R.D. (1992). *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*. Chapman & Hall, London.

Király, L., Cole, A.B., Bourque, J.E. and Schoelz, J.E. (1999). Systemic cell death is elicited by the interaction of a single gene in *Nicotiana clevelandii* and gene VI of cauliflower mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 919–925.

Kiselyova, O.I., Yaminsky, I.V., Karger, E.M., Frolova, O.Yu., Dorokhov, Y.L. and Atabekov, J.G. (2001). Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein-RNA complexes formed *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **82**, 1503–1508.

Kiss, T., Pósfai, J. and Solymosy, F. (1983). Sequence homology between potato spindle tuber viroid and U3B snRNA. *FEBS Lett.* **163**, 217–220.

Kiss-László, Z, Blanc, S. and Hohn, T. (1995). Splicing of cauliflower mosaic virus 35S RNA is essential for viral infectivity. *EMBO J.* **14**, 3552–3562.

Kitajima, E.W. and Costa, A.S. (1969). Association of pepper ringspot virus (Brazilian tobacco rattle virus) and host cell mitochondria. *J. Gen. Virol.* **4**, 177–181.

Kitajima, E.W. and Costa, A.S. (1973). Aggregates of chloroplasts in local lesions induced in *Chenopodium quinoa* wild. by turnip mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **20**, 413–416.

Kitajima, E.W. and Lauritis, J.A. (1969). Plant virions in plasmodesmata. *Virology* **37**, 681–685.

Kitajima, E.W. and Lovisolo, O. (1972). Mitochondrial aggregates in *Datura* leaf cells infected with henbane mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **16**, 265–271.

Kitajima, E.W., De Avila, A.C., Resende, R. de O., *et al.* (1992). Comparative cytological and immunogold labeling studies on different isolates of tomato spotted wilt virus. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **24**, 1014.

Kjemtrup, S., Sampson, K.S., Peele, C.G., Nguygen, L.V., Conkling, M.A., Thompson, W.F. and Robertson, D. (1998). Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant J.* **14**, 91–100.

Klaassen, V.A., Boeshore, M.L., Koonin, E.V., Tian, T. and Falk, B.W. (1995). Genome structure and phylogenetic analysis of lettuce infectious yellows virus, a whitefly-transmitted, bipartite crinivirus. *Virology* **208**, 99–110.

Klaff, P., Gruner, R., Hecker, R., Sättler, A., Theissen, G. and Riesner, D. (1989). Reconstituted and cellular viroid–protein complexes. *J. Gen. Virol.* **70**, 2257–2270.

Kleczkowski, A. (1949). The transformation of local lesion counts for statistical analysis. *Ann. Appl. Biol.* **36**, 139–152.

Kleczkowski, A. (1950). Interpreting relationships between concentrations of plant viruses and numbers of local lesions. *J. Gen. Microbiol.* **4**, 53–69.

Kleczkowski, A. (1953). A method for testing results of infectivity tests for plant viruses for compatibility with hypotheses. *J. Gen. Microbiol.* **8**, 295–301.

Klein, M. and Harpaz, I. (1970). Heat suppression of plant-virus propagation in the insect vector's body, *Virology* **41**, 72–76.

Klein, R.E., Wyatt, S.D. and Kaiser, W.J. (1988). Incidence of bean common mosaic virus in USDA *Phaseolus* germplasm collection. *Plant Dis.* **72**, 301–302.

Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. and Sanford, J.C. (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**, 70–73.

Klein, T.M., Arentzen, R., Lewis, P.A. and Fitzpatrick-McElligott, S. (1992). Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Biotechnology* **10**, 286–291.

Kleinhempel, H. and Kegler, G. (1982). Transmission of tomato bushy stunt virus without vectors. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **17**, 17–21.

Klessig, D.F., Durner, J., Navarre, D.A. *et al.* (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 8849–8855.

Klinkenberg, F.A., Ellwood, S. and Stanley, J. (1989). Fate of African cassava mosaic virus coat protein deletion mutants after agroinoculation. *J. Gen. Virol.* **70**, 1837–1844.

Klose, M.J., Sdoodee, R., Teakle, D.S., Milne, J.R., Greber, R.S. and Walter, G.H. (1996). Transmission of three strains of tobacco streak ilarvirus by different thrips species using virus-infected pollen. *J. Phytopathol.* **144**, 281–284.

Klöti, A., Heinrich, C., Bieri, S. *et al.* (1999). Upstream and downstream sequence elements determine the specificity of rice tungro bacilliform virus promoter and influence RNA production after transcription initiation. *Plant Mol. Biol.* **40**, 249–266.

Klug, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **354**, 531–535.

Klug, A. and Berger, J.E. (1964). An optical method for the analysis of periodicities in electron micrographs, and some observations on the mechanism of negative staining. *J. Mol. Biol.* **10**, 565–569.

Klug, A. and Caspar, D.L.D. (1960). The structure of small viruses. *Adv. Virus Res.* **7**, 225–325.

Klug, A., Longley, W. and Leberman, R. (1966). Arrangement of protein subunits and the distribution of nucleic acid in turnip yellow mosaic virus: I. X-ray diffraction studies. *J. Mol. Biol.* **15**, 315–343.

Knapp, E. and Lewandowski, D.J. (2001). Tobacco mosaic virus, not just a single component virus anymore. *Molec. Plant Pathol.* **2**, 117–123.

Knapp, E., da Câmara Machado, A., Pühringer, H. *et al.* (1995). Localization of fruit tree viruses by immuno-tissue printing in infected shoots of *Malus* sp. and *Prunus* sp. *J. Virol. Methods* **55**, 157–173.

Knebel, W., Quader, H. and Schnepf, E. (1990). Mobile and immobile endoplasmic reticulum in onion bulb epidermis cells: short and long-term observations with a confocal laser scanning microscope. *Eur. J. Cell Biol.* **52**, 328–340.

Knoester, M., van Loon, L.C., Heuvel, J.V.D., Hennig, J., Bol, J.F. and Linthorst, H.J.M. (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 1933–1937.

Knorr, D.A. and Dawson, W.O. (1988). A point mutation in the tobacco mosaic virus capsid protein gene induces hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 170–174.

Knowland, J., Hunter, T., Hunt, T. and Zimmern, D. (1975). Translation of tobacco mosaic virus RNA and isolation of the messenger for TMV coat protein. *Colloq. Inst. Natl Sante Rech. Med.* **47**, 211–216.

Kobayashi, K., Tsuge, S., Nakayashiki, H., Mise, K. and Furusawa, I. (1998). Evidence for a dual strategy in the expression of cauliflower mosaic virus open reading frames I and IV. *Microbiol. Immunol.* **42**, 329–334.

Koenig, R. (1976). A loop-structure in the serological classification system of tymoviruses. *Virology* **72**, 1–5.

Koenig, R. (1981). Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **55**, 53–62.

Koenig, R. (1986). Plant viruses in rivers and takes. *Adv. Virus Res.* **31**, 321–333.

Koenig, R. and Bercks, R. (1968). Änderungen in heterologen Reaktionsvermögen von Antiseren gegen Vertroter der potato virus X-Gruppe im Laufe des Immunisierungsprozesses. *Phytopathol. Z.* **61**, 382–398.

Koenig, R. and Burgermeister, W. (1986). Applications of immunoblotting in plant virus diagnosis. In: R.A.C. Jones and L. Torrance (eds) *Developments and Applications in Virus Testing*, Dev. Appl. Biol. 1, pp. 121–137. Association of Applied Biologists, Wellsbourne.

Koenig, R. and Gibbs, A. (1986). Serological relationships among tombusviruses. *J. Gen. Virol.* **67**, 75–82.

Koenig, R. and Givord, L. (1974). Serological interrelationships in the turnip yellow mosaic virus group. *Virology* **58**, 119–125.

Koenig, R. and Lesemann, D.E. (2000a). Genus *Pomovirus*. In: van Regenmortel *et al.* (eds) *Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, pp. 908–913. Academic Press, San Diego.

Koenig, R. and Lesemann, D.E. (2000b). Genus *Benyvirus*. In: van Regenmortel *et al.* (eds) *Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, pp. 917–922. Academic Press, San Diego.

Koenig, R. and Loss, S. (1997). Beet soil-borne virus RNA 1: genetic analysis enabled by a starting sequence generated with primers to highly conserved helicase-encoding domains. *J. Gen. Virol.* **78**, 3161–3165.

Koenig, R. and Paul, H.L. (1982). Variants of ELISA in plant virus diagnosis. *J. Virol. Methods* **5**, 113–125.

Koenig, R. and Torrance, L. (1986). Antigenic analysis of potato virus X by means of monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **67**, 2145–2151.

Koenig, R., Tremaine, J.H. and Shepard, J.F. (1978). *In situ* degradation of the protein chain of potato virus X at the N- and C-termini. *J. Gen. Virol.* **38**, 329–337.

Koenig, R., Fribourg, C.E. and Jones, R.A.C. (1979). Symptomatological, serological and electrophoretic diversity of isolates of Andean potato latent virus from different regions of the Andes. *Phytopathology* **69**, 748–752.

Koenig, R., An, D. and Burgermeister, W. (1988a). The use of filter hybridisation techniques for the identification, differentiation and classification of plant viruses. *J. Virol. Methods* **19**, 57–68.

Koenig, R., An, D., Lesemann, D.E. and Burgermeister, W. (1988b). Isolation of carnation ringspot virus from a canal near a sewage plant: cDNA hybridization analysis, serology, and cytopathology. *J. Phytopathol.* **121**, 346-356.

Koenig, R., Luddecke, P. and Haberle, A.M. (1995). Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-stranded conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *J. Gen. Virol.* **76**, 2051–2055.

Koenig, R., Beier, C., Commandeur, U., Lüth, U., Kaufmann, A. and Lüddecke, P. (1996). Beet soil-borne virus RNA 3: a further example of the heterogeneity of the gene content of furovirus genomes and of triple gene block-carrying RNAs. *Virology* **216**, 202–207.

Koenig, R., Commandeur, U., Loss, S., Beier, C., Kaufmann, A. and Lesemann, D.-E. (1997). Beet soil-borne virus RNA-2: similarities and dissimilarities to the coat protein gene-carrying RNAs of other furoviruses. *J. Gen. Virol.* **78**, 469–477.

Koev, G., Mohan, B.R., Dinesh-Kumar, S.P., Torbert, K.A., Somers, D.A. and Miller, W.A. (1998). Extreme reduction of disease in oats transformed with the 5′ half of the barley yellow dwarf virus-PAV genome. *Phytopathology* **88**, 1013–1019.

Koev, G., Mohan, B.R. and Miller, W.A. (1999). Primary and secondary structural elements required for synthesis of barley yellow dwarf virus subgenomic RNA-1. *J. Virol.* **73**, 2867–2885.

Kohl, R.J. and Hall, T.C. (1974). Aminoacylation of RNA from several viruses: amino acid specificity and differential activity of plant, yeast and bacterial synthetases. *J. Gen. Virol.* **25**, 257–261.

Kohl, R.J. and Hall, T.C. (1977). Loss of infectivity of brome mosaic virus RNA after chemical modification of the 3′ or 5′ terminus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 2682–2686.

Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (Lond.)* **256**, 495–497.

Kohli, A., Griffiths, S., Palacios, N. *et al.* (1999a). Molecular characterization of transformed plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombinational hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *Plant J.* **17**, 591–601.

Kohli, A., Gahakawa, D., Vain, P., Laurie, D.A. and Christou, P. (1999b). Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta* **208**, 88–97.

Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A. and Steitz, T.A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**, 1783–1790.

Köhm, B.A., Goulden, M.G., Gilbert, J.E., Kavanagh, T.A. and Baulcombe, D.C. (1993). A potato X resistance gene mediates an induced nonspecific resistance in protoplasts. *Plant Cell* **5**, 913–920.

Kolk, M.H., van der Graaf, M., Wijmenga, S.S., Pleij, C.W.A., Heus, H.A. and Hilbers, C.W. (1998). NMR structure of a classical pseudoknot: interplay of single- and double-stranded RNA. *Science* **280**, 434–438.

Kollár, A. and Burgyán, J. (1994). Evidence that ORF 1 and 2 are the only virus-encoded replicase genes of cymbidium ringspot tombusvirus. *Virology* **201**, 169–172.

Kollár, A., Dalmay, T. and Burgyán, J. (1993). Defective interfering RNA-mediated resistance against cymbidium ringspoy tombusvirus in transgenic plants. *Virology* **193**, 313–318.

Konaté, G. and Fritig, B. (1983). Extension of the ELISA method to the measurement of the specific radioactivity of viruses in crude cellular extracts. *J. Virol. Meth.* **6**, 347–356.

Konaté, G. and Fritig, B. (1984). An efficient microinoculation procedure to study plant virus multiplication at predetermined individual infection sites on the leaves. *Phytopathol. Z.* **109**, 131–138.

Konaté, G., Barro, N., Fargette, D., Swanson, M.M. and Harrison, B.D. (1995). Occurrence of whitefly-transmitted geminiviruses in crops in Burkino Faso, and their serological detection and differentiation. *Ann. Appl. Biol.* **126**, 121–129.

Kong, F., Sivakumaran, K. and Kao, C. (1999). The N-terminal half of brome mosaic virus 1a protein has RNA capping-associated activities: specificity for GTP and S-adenosylmethionine. *Virology* **259**, 200–210.

Kong, Q., Oh, J.-W. and Simon, A.E. (1995). Symptom attenuation by a normally virulent satellite RNA of turnip crinkle virus is associated with the coat protein open reading frame. *Plant Cell* **7**, 1625–1634.

Kong, Q., Oh, J.-W., Carpenter, C.D. and Simon, A.E. (1997a). The coat protein of turnip crinkle virus is involved in subviral RNA-mediated symptom modulation and accumulation. *Virology* **238**, 478–485.

Kong, Q., Wang, J. and Simon, A.E. (1997b). Satellite RNA-mediated resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* involves a reduction in virus movement. *Plant Cell* **9**, 2051–2063.

Kontzog, H.G., Kleinhempel, H. and Kegler, H. (1988). Detection of plant pathogenic viruses in waters. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz.* **24**, 171–172.

Koonin, E.V. (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **72**, 2197–2206.

Koonin, E.V. and Dolja, V.V. (1993). Evolution and taxonomy of positive strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Biochem. Mol. Biol.* **28**, 357–430.

Koonin, E.V. and Gorbalenya, A.E. (1989). Evolution of RNA genomes: does the high mutation rate necessitate high rate of evolution of viral proteins? *J. Mol. Evol.* **28**, 524–527.

Kopp, M., Geoffrey, P. and Fritig, B. (1981). Studies on tobacco mosaic virus replication by means of radiolabelling the virus under isotonic conditions. *Ann. Phytopathol.* **12**, 314.

Kopp, M., Rouster, L., Fritig, B., Darvill, A. and Albersheim, P. (1989). Host–pathogen interactions. XXXII. A fungal glucan preparation protects *Nicotiana* against infection by viruses. *Plant Physiol.* **90**, 208–216.

Kormelink, R., van Poelwijk, F., Peters, D. and Goldbach, R. (1992a). Non-viral heterogeneous sequences at the 5' ends of tomato spotted wilt virus mRNAs. *J. Gen. Virol.* **73**, 2125–2128.

Kormelink, R., de Haan, P., Meurs, C., Peters, D. and Goldbach, R. (1992b). The nucleotide sequence of the mRNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *J. Gen. Virol.* **73**, 2795–2804.

Kormelink, R., Storms, M., van Lent, J., Peters, D. and Goldbach, R. (1994). Expression and subcellular location of the NS_M protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* **200**, 56–65.

Kotlisky, G., Boulton, M.I., Pitaksutheepong, C., Davies, J.W. and Epel, B.L. (2000). Intracellular and intercellular movement of maize streak geminivirus V1 and V2 proteins transiently expressed as green fluorescent protein fusions. *Virology* **274**, 32–38.

Kozak, M. (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucl. Acids Res.* **9**, 5233–5252.

Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283–292.

Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* **108**, 229–241.

Kozak, M. (1992). Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 197–225.

Kozak, M. (2001). New ways of initiating translation in eukaryotes? *Molec. Cell. Biol.* **21**, 1899–1907.

Krajacic, M., Mamula, D and Juretic, N. (1992). Determination of serological differentiation index values of turnip yellow mosaic virus (TYMV) strains by single radial immunodiffusion. *Periodicum Biologorum* **94**, 221–225.

Krczal, G. (1998). Virus certification of ornamental plants—the European strategy. Breeding for resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 277–287.. APS Press, St. Paul, MN.

Kricka, L.J. (ed.) (1993). *Nonisotopic DNA Probe Techniques*. Academic Press, San Diego.

Krishna, S., Hiremath, C.N., Munshi, S.K. *et al.* (1999). Three-dimensional structure of physalis mottle virus: implications for the viral assembly. *J. Mol. Biol.* **289**, 919–934.

Krol, M.A., Olson, N.H., Tate, J., Johnson, J.E., Baker, T.S. and Ahlquist, P. (1999). RNA-controlled polymorphism in the *in vivo* assembly of 180-subunit and 120-subunit virions from a single capsid protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 13650–13655.

Kroner, P., Richards, D., Traynor, P. and Ahlquist, P. (1989). Defined mutations in a small region of the brome mosaic virus 2a gene cause diverse temperature-sensitive RNA replication phenotypes. *J. Virol.* **63**, 5302–5309.

Kruckelmann, H.-W. and Seyffert, W. (1970). Wechselwirkungen zwischen einem turnip-mosaik-Virus und dem Genom des Wirtes. *Theor. Appl. Genet.* **40**, 121–123.

Krüse, J., Krüse, K.M., Witz, J., Chauvin, C., Jacrot, B. and Tardieu, A. (1982). Divalent ion-dependent reversible swelling of tomato bushy stunt virus and organisation of the expanded virion. *J. Mol. Biol.* **162**, 393–417.

Krüse, J., Timmins, P. and Witz, J. (1987). The spherically averaged structure of a DNA isometric plant virus: cauliflower mosaic virus. *Virology* **159**, 166–168.

Krüse, M., Koenig, R., Hoffmann, A. *et al.* (1994). Restriction fragment length polymorphism analysis of revese transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. *J. Gen. Virol.* **75**, 1835–1842.

Kryczynski, S., Paduch-Cichal, E. and Skrzeczkowski, L.J. (1988). Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plants. *J. Phytopathol. 121*, 51–57.

Kubo, S., Harrison, B.D., Robinson, D.J. and Mayo, M.A. (1975a). Tobacco rattle virus in tobacco mesophyll protoplasts: infection and virus multiplication. *J. Gen. Virol.* **27**, 293–304.

Kubo, S., Harrison, B.D. and Barker, H. (1975b). Defined conditions for growth of tobacco plants as sources of protoplasts for virus infection. *J. Gen. Virol.* **28**, 255–257.

Kudo, H., Uyeda, I. And Shikata, E. (1991). Viruses in the *Phytoreovirus* genus of the *Reoviridae* family have the same conserved terminal sequences. *J. Gen. Virol.* **72**, 2857–2866.

Kuhn, C.W. and Bancroft, J.B. (1961). Concentration and specific infectivity changes of alfalfa mosaic virus during systemic infection. *Virology* **18**, 281–288.

Kumar, A., Reddy, V.S., Yusibov, V. *et al.* (1997). The structure of alfalfa mosaic virus capsid protein assembled as a $T = 1$ icosahedral particles at 4.0 Å resolution. *J. Virol.* **71**, 7911–7916.

Kumagai, M.H., Turpen, T.H., Weinzettl, N., Della-Cioppa, G., Turpen, A.M., Donson, J., Hilf, M.E., Grantham, G.L., Dawson, W.O., Chow, T.P., Piatak, M. Jr. and Grill, L.K. (1993). Rapid, high-level expression of biologically active —trichosanthin in transfected plants by an RNA viral vector. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 427–430.

Kumagai, M.H., Donson, J., Dell-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. and Grill, L.K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotinoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 1679–1683.

Kummert, J. and Semal, J. (1969). Study of the incorporation of radioactive uridine into virus-infected leaf fragments. *Phytopathol. Z.* **65**, 101–123.

Kunik, T., Palanichelvam, K., Czosnek, H., Citovsky, V. and Gafni, Y. (1998). Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plants and insect cells. *Plant J.* **13**, 393–399.

Kunkel, L.O. (1922). Insect transmission of yellow stripe disease. *Hawaii Plant. Rec.* **26**, 58–64.

Kuntz, I.D. and Kauzmann, W. (1974). Hydration of proteins and polypeptides. *Adv. Protein Chem.* **28**, 239–345.

Kurath, G. and Palukaitis, P. (1989a). Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: recombinants constructed in vitro reveal independent functional domains for chlorosis and necrosis in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2**, 91–96.

Kurath, G. and Palukaitis, P. (1989b). RNA sequence heterogeneity in natural populations of three satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Virology* **173**, 231–240.

Kurkinen, M. (1981). Fidelity of protein synthesis affects the read through translation of tobacco mosaic virus RNA. *FEBS Lett.* **124**, 79–83.

Kurtz-Fritsch, C. and Hirth, L. (1972). Uncoating of two spherical plant viruses. *Virology* **47**, 385–396.

Kuwata, S., Masuta, C. and Takanami, Y. (1991). Reciprocal phenotype alterations between two satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **72**, 2385–2389.

Laasko, M.M. and Heaton, L.A. (1993). Asp–Asn substitutions in the putative calcium binding site of the turnip crinkle coat protein affect virus movement in plants. *Virology* **197**, 774–777.

Lackey, C.F. (1932). Restoration of virulence of attenuated curleytop virus by passage through *Stellaria media*. *J. Agric. Res.* **44**, 755–765.

Laco, G.S. and Beachy, R.N. (1994). Rice tungro bacilliform virus encodes reverse transcriptase, DNA polymerase and ribonucleases H activities. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 2654–2658.

Laco, G.S., Kent, S.B.H. and Beachy, R.N. (1995). Analysis of proteolytic processing and activation of the rice tungro bacilliform virus reverse transcriptase. *Virology* **208**, 207–214.

Laflèche, D. and Bové, J.M. (1968). Sites d'incorporation de l'uridine tritiée dans les cellules du parenchyma foliate de *Brassica chinensis*, saines on infectées par le virus de la mosaique jaune du navet. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **266**, 1839–1841.

Laflèche, D., Bové, C., Dupont, G. *et al.* (1972). Site of viral RNA replication in the cells of higher plants: TYMV–RNA synthesis on the chloroplast outer member system. *Proc. FEBS Meet.* **27**, 43–71.

Lafontaine, D., Beaudry, D., Marquis, P. and Perreault, J.P. (1995). Intra- and intermolecular nonenzymatic ligations occur within transcripts derived from peach latent mosaic viroid. *Virology* **212**, 705–709.

Lai, M.M.C. (1992). RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.* **56**, 61–79.

Laidlaw, W.M.R. (1986). Mechanical aids to improve the speed and sensitivity of plant virus diagnosis by the biological test method. *Ann. Appl. Biol.* **108**, 309–318.

Laidlaw, W.M.R. (1987). A new method for mechanical virus transmission and factors affecting its sensitivity. *OEPP/EPPO Bull.* **17**, 81–89.

Lakshman, D.K. and Gonsalves, D. (1985). Genetic analysis of two large-lesion isolates of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **75**, 758–762.

Lakshman, D.K., Gonsalves, D. and Fulton, R.W. (1985). Role of *Vigna* species in the appearance of pathogenic variants of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **75**, 751–757.

Lakshman, D.K., Hiruki, C., Wu, X.N. and Leung, W.C. (1986). Use of [^{32}P]RNA probes for the dot-hybridization detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol. Methods* **14**, 309–319.

Lam, Y.H., Wong, Y.S., Wang, B., Wong, R.N.S., Yeung, H.W. and Shaw, P.C. (1996). Use of trichosanthin to reduce infection by turnip mosaic virus. *Plant Sci.* **114**, 111–117.

Lambowitz, A.M. and Belford, M. (1993). Introns as mobile genetic elements. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 587–622.

Lana, A.F. (1981). Prospects of infectivity tests as a tool in plant virus disease diagnosis in the third world. *Trop. Pest Manage.* **27**, 24–28.

Lanczycki, C.J., Johnson, C.A., Trus, B.L., Conway, J.F., Steven, A.C. and Martino, R.L. (1998). Parallel computing strategies for determining viral capsid structure by cryoelectron microscopy. *IEEE Comput. Sci. Eng.* **5**, 76–91.

Lange, L. (1975). Infection of *Daucus carota* by tobacco necrosis virus. *Phytopathol. Z.* **83**, 136–143.

Lange, L. and Heide, M. (1986). Dot immunobinding (DIB) for detection of virus in seed. *Can. J. Plant Pathol.* **8**, 373–379.

Langenberg, W.G. (1979). Chilling of tissue before glutaraldehyde fixation preserves fragile inclusions of several plant viruses. *J. Ultrastruct. Res.* **66**, 120–131.

Langenberg, W.G. (1982). Fixation of plant inclusions under conditions designed for freeze-fracture. *J. Ultrastruct. Res.* **81**, 184–188.

Langenberg, W.G. (1986a). Virus protein associated with the cylindrical inclusions of two viruses that infect wheat. *J. Gen. Virol.* **67**, 1161–1168.

Langenberg, W.G. (1986b). Deterioration of several rod-shaped wheat viruses following antibody decoration. *Phytopathology* **76**, 339–341.

Langenberg, W.G. (1987). Barley stripe mosaic virus but not brome mosaic virus binds to wheat streak mosaic virus cylindrical inclusions *in vivo*. *Phytopathology* **78**, 589–594.

Langenberg, W.G. (1989). Rapid antigenic modification of wheat streak mosaic virus *in vitro* is prevented in glutaraldehyde fixed tissue. *J. Gen. Virol.* **70**, 969–973.

Langenberg, W.G. and Schroeder, H.F. (1975). The ultrastructural appearance of cowpea mosaic virus in cowpea. *J. Ultrastruct. Res.* **51**, 166–175.

Langereis, K., Mugnier, M.-A., Cornelissen, B.J.C., Pinck, L. and Bol, J.F. (1986). Variable repeats and poly (A)-stretches in the leader sequence of alfalfa mosaic virus RNA3. *Virology* **154**, 409–414.

Langeveld, S.A., Dore, J.M., Memelink, J. *et al.* (1991). Identification of potyviruses using polymerase chain reaction with degenerate primers. *J. Gen. Virol.* **72**, 1531–1541.

Lanter, J.M., McQuire, J.M. and Goode, M.J. (1982). Persistence of tomato mosaic virus in tomato debris and soil under field conditions. *Plant Dis. Rep.* **66**, 552–555.

Lapierre, H., Cortillot, M., Kusiak, C. and Hariri, D. (1985). Field resistance of autumn-sown wheat to wheat soil-borne mosaic virus (WSBMV) *Agronomie* **5**, 565–572.

Laquel, P., Ziegler, V. and Hirth, L. (1986). The 80K polypeptide associated with the replication complexes of cauliflower mosaic virus is recognised by antibodies to gene V translation product. *J. Gen. Virol.* **67**, 197–201.

Larson, R.H., Matthews, R.E.F. and Walker, J.C. (1950). Relationships between certain viruses affecting the genus *Brassica*. *Phytopathology* **40**, 955–962.

Larson, S.B., Koszelak, S., Day, J., Greenwood, A., Dodds, J.A. and McPherson, A. (1993a). Double helical RNA in satellite tobacco mosaic virus. *Nature (London)* **361**, 179–182.

Larson, S.B., Koszelak, S., Day, J., Greenwood, A., Dodds, J.A. and McPherson, A. (1993b). Three-dimensional structure of satellite tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **231**, 375–391.

Lartey, R. and Citovsky, V. (1997). Nucleic acid transport in plant–pathogen interactions. *Genet. Eng. (NY)* **19**, 201–214.

Lartey, R., Ghoshroy, S., Ho J. and Citovsky, V. (1997). Movement and subcellular localization of a tobamovirus in *Arabidopsis*. *Plant J.* **12**, 537–545.

Lartey, R.T., Ghoshroy, S. and Citovsky, V. (1998). Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutation (*vsm1*) that restricts systemic movement of tobamoviruses. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **11**, 706–709.

Lastra, J.R. and Esparza, J. (1976). Multiplication of vesicular stomatitis virus in the leafhopper *Peregrinus maidis* (Ashm), a vector of a plant rhabdovirus. *J. Gen. Virol.* **32**, 139–142.

Lastra, J.R. and Schlegel, D.E. (1975). Viral protein synthesis in plants infected with broadbean mottle virus. *Virology* **65**, 16–26.

Latham, J.R., Saunders, K., Pinner, M.S. and Stanley, J. (1997). Induction of plant cell division by beet curly top virus gene *C4*. *Plant J.* **11**, 1273–1283.

Lauber, E., Guilley, H., Tamada, T., Richards, K.E. and Jonard, G. (1998a). Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA3 sequence domain rather than a gene product. *J. Gen. Virol.* **79**, 385–393.

Lauber, E., Bleykasten-Grosshans, C., Erhardt, M. *et al.* (1998b). Cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus: 1. Heterologous complementation experiments provide evidence for specific interactions among triple gene block proteins. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **11**, 618–625.

Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F. *et al.* (1995). *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 3879–3883.

Laurence, J.A., Aluiso, A.L., Weinstein, L.H. and McCune, D.C. (1981). Effect of sulphur dioxide on southern bean mosaic and maize dwarf mosaic. *Environ. Poll. Ser. A* **24**, 185–191.

Laviolette, F.A. and Athow, K.L. (1971). Longevity of tobacco ringspot virus in soybean seed. *Phytopathology* **61**, 755.

Lawrence, D.M. and Jackson, A.O. (1999). Hordeiviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp.749–753. Academic Press, San Diego.

Lawrence, D.M. and Jackson, A.O. (2001). Requirements for cell-to-cell movement of barley stripe mosaic virus in monocot and dicot hosts. *Molec. Plant Pathol.* **2**, 65–75.

Lawrence, D.M., Solovyer, A.G., Morozov, S. *et al.* (2000). Genus *Hordeivirus*. In: van Regenmortel *et al.* (eds) *Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, pp. 899–904. Academic Press, San Diego.

Lawrence, J. (1714). *The Clergyman's Recreation*, 2nd edn. B. Lintott, London.

Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L. *et al.* (1990). Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Biotechnology* **8**, 127–134.

Lawson, R.H. and Taconis, P.J. (1965). Transfer of dahlia mosaic virus with liquid nitrogen and relation of transfer to symptoms and inclusions. *Phytopathology* **55**, 715–718.

Lawson, R.H., Hearon, S.S. and Smith, F.F. (1971). Development of pinwheel inclusions associated with sweet potato russet crack virus. *Virology* **46**, 453–463.

Lawton, J.A., Estes, M.K. and Prasad, B.V.V. (2000). Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv. Virus Res.* **55**, 185–229.

Lawton, M.A., Tierney, M.A., Nakamura, I. *et al.* (1987). Expression of a soybean β-conglycinin gene under the control of the cauliflower mosaic virus 35S and 19S promoters in transformed petunia tissue. *Plant Mol. Biol.* **9**, 315–324.

Lazarowitz, S.G. (1987). The molecular characterisation of geminiviruses. *Plant Mol. Biol. Rep.* **4**, 177–192.

Lazarowitz, S.G. (1988). Infectivity and complete nucleotide sequence of the genome of a South African isolate of maize streak virus. *Nucl. Acids Res.* **16**, 229–249.

Lazarowitz, S.G. (1991). Molecular characterisation of two bipartite geminiviruses causing squash leaf curl disease: role of transactivation and defective genomic components in determining host range. *Virology* **180**, 70–80.

Lazarowitz, S.G. and Beachy, R.N. (1999). Viral movement proteins as probes for investigating intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* **11**, 535–548.

Lazarowitz, S.G., Pinder, A.J., Damsteegt, V.D. and Rogers, S.G. (1989). Maize streak virus genes essential for systemic spread and symptom development. *EMBO J.* **8**, 1023–1032.

Lazarowitz, S.G., Wu, L.C., Rogers, S.G and Elmer, J.S. (1992). Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. *Plant Cell* **4**, 799–809.

Leapman, R.D. and Rizzo, N.W. (1999). Towards single atom analysis of biological structures. *Ultramicroscopy* **78**, 251–268.

Leathers, V., Tanguay, R., Kobayashi, M and Gallie, D.R. (1993). A phylogenetically conserved sequence within the viral 3′ untranslated RNA pseudoknots regulates translation. *Mol. Cell Biol.* **13**, 5331–5347.

Lebeurier, G. and Hirth, L. (1966). Effect of elevated temperatures on the development of two strains of tobacco mosaic virus. *Virology* **29**, 385–395.

Lebeurier, G., Nicolaieff, A. and Richards, K.E. (1977). Inside-out model for self-assembly of tobacco mosaic virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 149–153.

Lebeurier, G., Hirth, L., Hohn, B. and Hohn, T. (1982). *In vivo* recombination of cauliflower mosaic virus DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 2932–2936.

Leclerc, D., Burri, L., Kajava, A.V., Mougeot, J.L., Hess, D., Lustig, A., Kleemann, G. and Hohn T. (1998). The open reading frame III product of cauliflower mosaic virus forms a tetramer through a N-terminal coiled-coil. *J. Biol. Chem.* **273**, 29015–29021.

Leclerc, D., Chapdelaine, Y. and Hohn, T. (1999). Nuclear targeting of the cauliflower mosaic virus coat protein. *J. Virol.* **73**, 553–560.

Lecoq, H. (1998). Control of plant virus diseases by cross protection. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 33–40. APS Press, St. Paul, MN.

Lecoq, H. (1999). Epidemiology of cucurbit aphid-borne yellows virus. In: H.G. Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp. 243–248. CAB International, Wallingford, UK.

Lecoq, H. and Pitrat, M. (1985). Specificity of the helper-component-mediated aphid transmission of three potyviruses infecting muskmelon. *Phytopathology* **75**, 890–893.

Lecoq, H., Pitrat, M. and Labonne, G. (1981). Resistance to virus transmission by aphids in a *Cucumis melo* lines presenting non-acceptance to *Aphis gossypii*. *Bull. SROP* **4**, 147–151.

Lecoq, H., Ravelonandro, M., Wopf-Scheibel, C., Monsion, M., Raccah, B. and Dunez, J. (1993). Aphid transmission of a non-aphid-transmissible strain of zucchini yellow mosaic potyvirus from transgenic plants expressing the capsid protein of plum pox potyvirus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**, 403–406.

Lee, C.L. and Black, L.M. (1955). Anatomical studies of *Trifolium incarnartum* infected by wound tumor virus. *Am. J. Bot.* **42**, 160–168.

Lee, C.R. and Singh, R.P. (1972). Enhancement of diagnostic symptoms of potato spindle tuber virus by manganese. *Phtopathology* **62**, 516–520.

Lee, I.M., Hammond, R.W. Davis, R.E. and Gundersen, D.E. (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rRNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* **83**, 834–842.

Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E. and Bertaccini, A. (1998a). Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology* **88**, 1359–1366.

Lee, J.-M., Hartman, G.L., Domier, L.L. and Bent, A.F. (1996). Identification and map location of *TTR1*, a single locus in *Arabidopsis thaliana* that confers tolerance to tobacco ringspot nepovirus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**, 729–735.

Lee, L. and Anderson, E.J. (1998). Nucleotide sequence of a resistance breaking mutant of southern bean mosaic virus. *Arch Virol.* **143**, 2189–2201.

Lee, P.E., Boerjan, M. and Peters, D. (1972). Electron microscopic evidence for a neuraminic acid in sowthistle yellow vein virus. *Virology* **50**, 309–311.

Lee, R.F., Garnsey, S.M., Briansky, R.H. and Goheen, A.C. (1987). A purification procedure for enhancement of citrus tristeza virus yields and its application to other phloem limited viruses. *Phytopathology* **77**, 543–549.

Lee, Y.-S. and Ross, J.P. (1972). Top necrosis and cellular changes in soybean doubly infected by soybean mosaic and bean pod mottle viruses. *Phytopathology* **62**, 839–845.

Lee, Y.-S., Lin, B.Y., Hsu, Y.H., Chang, B.Y. and Lin, N.S. (1998b). Subgenomic RNAs if bamboo mosaic potexvirus-V isolate are packaged into virions. *J. Gen. Virol.* **79**, 1825–1832.

Legg, J.T. and Lockwood, G. (1977). Evaluation and use of a screening method to aid selection of cocoa (*Theobroma cacao*) with field resistance to cocoa swollen-shoot virus in Ghana. *Ann. Appl. Biol.* **86**, 241–248.

Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A. *et al.* (1999). Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein. *EMBO J.* **18**, 7077–7085.

Leh, V., Yot, P. and Keller, M. (2000). The cauliflower mosaic virus translation transactivator interacts with the 60S ribosomal subunit protein L 18 of Arabidopsis thaliana. *Virology* **266**, 1–7.

Lehto, K. and Dawson, W.O. (1990). Changing the start codon context of the 30K gene of tobacco mosaic virus from 'weak' to 'strong' does not increase expression. *Virology* **174**, 169–176.

Lehto, K., Grantham, G.L. and Dawson, W.O. (1990a). Insertion of sequences containing the coat protein subgenomic RNA promoter and leader in front of the tobacco mosaic virus 30K ORF delays its expression and causes defective cell-to-cell movement. *Virology* **174**, 145–157.

Lehto, K., Bubrick, P. and Dawson, W.O. (1990b). Time course of TMV 30K protein accumulation in intact leaves. *Virology* **174**, 290–293.

Lei, J.D. and Agrios, G.N. (1986). Mechanisms of resistance in corn to maize dwarf mosaic virus. *Phytopathology* **76**, 1034–1040.

Leimkühler, M., Goldbeck, A., Lechner, M.D. and Witz, J. (2000). Conformational changes preceding decapsidation of bromegrass mosaic virus under hydrostatic pressure: a small-angle neutron scattering study. *J. Mol. Biol.* **296**, 1295–1305.

Leisner, R.-M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A. *et al.* (1992a). Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 9136–9140.

Leisner, S.M., Turgeon, R. and Howell, S.H. (1992b). Long-distance movement of cauliflower mosaic virus in infected turnip plants. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **5**, 41–47.

Leisner, S.M., Agama, K., Hapiak, M. and Li, Y. (2001). Identification of cauliflower mosaic virus gene VI protein regions involved in resistance breakage and self association. Abstract W21–6, 20[th] Annual Meeting of the American Society for Virology.

Lekkerkerker, A.-M., Wellink, J., Yuan, P., van Lent, J., Goldbach, R. and van Kammen, A. (1996). Distinct functional domains in the cowpea mosaic virus movement protein. *J. Virol.* **70**, 5658–5661.

Leonard, D.A. and Zaitlin, M. (1982). A temperature-sensitive strain of tobacco mosaic defective in cell-to-cell movement generates an altered viral-coded protein. *Virology* **117**, 416–424.

Léonard, S., Plante, D., Wittmann,S., Daigneault, N. Fortin, M.G. and Laliberté J.-F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J. Virol.* **74**, 7730–7737.

Leppik, E.E. (1970). Gene centers of plants as sources of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **8**, 323–344.

Lesemann, D.-E. (1988). Cytopathology. In: R.G. Milne (ed.) *The Plant Viruses. Vol. 4: The Filamentous Plant Viruses*, pp. 179–235. Plenum Press, New York.

Lesemann, D.E., Koenig, R., Torrance, L. *et al.* (1990). Electron-microscopical demonstration of different binding sites for monoclonal antibodies on particles of beet necrotic yellow vein virus. *J. Gen. Virol.* **71**, 731–733.

Leung, D.W., Gilbert, C.W., Smith, R.E., Sasavage, N.L. and Clark, J.M., Jr. (1976). Translation of satellite tobacco necrosis virus ribonucleic acid by an *in vitro* system from wheat germ. *Biochemistry* **15**, 4943–4950.

Levy, D. and Marco, S. (1976). Involvement of ethylene in epinasty of CMV-infected cucumber cotyledons which exhibit increased resistance to gaseous diffusion. *Physiol. Plant Pathol.* **9**, 121–126.

Lewandowski, D.J. and Dawson, W.O. (1993). A single amino acid change in tobacco mosaic virus replicase prevents symptom production. *Mol. Plant-Microbe Interact* **6**, 157–160.

Lewandowski, D.J. and Dawson, W.O. (1998a). Deletion of internal sequences results in tobacco mosaic virus defective RNAs that accumulate to high levels without interfering with replication of the helper virus. *Virology* **251**, 427–437.

Lewandowski, D.J. and Dawson, W.O. (1998b). The *cis*-preferential nature of tobacco mosaic virus min-strand synthesis can be uncoupled from translation. In *Abstracts of the American Society for Virology*, Vancouver, P2-06.

Lewandowski, D.J. and Dawson, W.O. (1999). Tobamoviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1780–1783. Academic Press, San Diego.

Lewandowski, D.J. and Dawson, W.O. (2000). Functions of the 126- and 183-kDa proteins of tobacco mosaic virus. *Virology* **271**, 90–98.

Lewis, T. and Dibley, G.C. (1970). Air movement near windbreaks and a hypothesis of the mechanism of the accumulation of airborne insects. *Ann. Appl. Biol.* **66**, 477–484.

Li, H.-W., Lucy, A.P., Guo, H.-S. *et al.* (1999). Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO J.* **18**, 2683–2691.

Li, W.-H., Wolfe, K.H., Sourdis, J. and Sharp, P.M. (1987). Reconstruction of phylogenetic trees and estimation of divergence times under non-constant rates of evolution. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**, 847–856.

Li, W.-Z., Qu, F. and Morris, T.J. (1998). Cell-to-cell movement of turnip crinkle virus is controlled by two small open reading frames that function *in trans*. *Virology* **244**, 405–418.

Li, X. and Carrington, J.C. (1995). Complementation of tobacco etch potyvirus mutants by active RNA polymerase expressed in transgenic cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 457–461.

Li, X., Heaton, L.A., Morris, J. and Simon, A.E. (1989). Turnip crinkle defective interfering RNAs intensify viral symptoms and are generated *de novo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 9173–9177.

Li, X., Valdez, P., Olvera, R.E. and Carrington, J.C. (1997). Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *J. Virol.* **71**, 1598–1607.

Li, X., Ryan, M.D. and Lamb, J.W. (2000). Potato leafroll virus protein P1 contains a serine proteinase domain. *J. Gen. Virol.* **81**, 1857–1864.

Liao, C.L. and Lai, M.M. (1994). Requirement of the 5'-end genomic sequence as an upstream *cis*-acting element for coronavirus subgenomic mRNA transcription. *J. Virol.* **68**, 4727–4737.

Liebe, S. and Quader, H. (1994). Myosin in onion (*Allium cepa*) bulb scale epidermal cells: involvement in the dynamics of organelles and endoplasmic reticulum. *Physiol. Plant* **90**, 114–124.

Liljås, L., Unge, T., Alwyn Jones, T. *et al.* (1982). Structure of satellite tobacco necrosis virus at 3.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **159**, 93–108.

Lilley, C.J., Devlin, F., Urwin, P.E. and Atkinson, H.J. (1999). Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants. *Parasitol. Today* **15**, 414–417.

Lim, T.M., Chng, C.G. and Wong, S.M. (1996). Study of the three-dimensional images of potyvirus-induced cytoplasmic inclusions using confocal laser scanning microscopy. *J. Virol. Meth.* **60**, 139–145.

Lima, M.I., Fonseca, M.E.N., Flores, R. and Kitajima, E.W. (1994). Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by *in situ* hybridization. *Arch Virol.* **138**, 385–390.

Lin, B. and Heaton, L.A. (1999). Mutational analyses of the putative calcium binding site and hinge of the turnip crinkle virus coat protein. *Virology* **259**, 34–42.

Lin, B. and Heaton, L.A. (2001). An *Arabidopsis thaliana* protein interacts with a movement protein of turnip crinkle virus in yeast cells and *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **82**, 1245–1251.

Lin, N.-S. and Langenberg, W.G. (1984a). Chronology of appearance of barley stripe mosaic virus protein in infected wheat cells. *J. Ultrastruct. Res.* **89**, 309–323.

Lin, N.-S. and Langenberg, W.G. (1984b). Distribution of barley stripe mosaic virus protein in infected wheat root and shoot tips. *J. Gen. Virol.* **65**, 2217–2224.

Lin, N.-S. and Langenberg, W.G. (1985). Peripheral vesicles in proplastids of barley stripe mosaic virus-infected wheat cells contain double-stranded RNA. *Virology* **142**, 291–298.

Lin, N.-S., Hsu, Y.-H. and Chiu, R.-J. (1987). Identification of viral structural proteins in the nucleoplasm of potato yellow dwarf virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* **68**, 2723–2728.

Lin, N.-S., Lin, F.Z., Huang, T.Y. and Hsu, Y.H. (1992). Genome properties of bamboo mosaic virus. *Phytopathology* **82**, 731–734.

Lin, N.-S., Lin, B.-Y., Lo, N.-W., Hu, C.-C., Chow, T.-W. and Hsu, Y.-H. (1994). Nucleotide sequence of the genomic RNA of bamboo mosaic potexvirus. *J. Gen. Virol.* **75**, 2513–2518.

Lin, N.-S., Lee, Y.-S., Lin, B.-Y., Lee, C.W. and Hsu, Y.-H. (1996). The open reading frame of bamboo mosaic potexvirus satellite RNA is not essential for its replication and can be replaced by a bacterial gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 3138–3142.

Lin, T.W., Chen, Z.G., Usha, R. *et al.* (1999). The refined crystal structure of cowpea mosaic virus at 2.8 angstrom resolution. *Virology* **265**, 20–34.

Lin, T.W., Clark, A.J., Chen, Z.G. *et al.* (2000). Structural fingerprinting: subgrouping of comoviruses by structural studies of red clover mottle virus to 2.4-Å resolution and comparisons with other comoviruses. *J. Virol.* **74**, 493–504.

Lindbeck, A.G.C., Dawson, W.O. and Thomson, W.W. (1991). Coat protein-related polypeptides from *in vitro* tobacco mosaic virus coat protein mutants do not accumulate in the chloroplasts of directly inoculated leaves. *Mol. Plant Microbe Interact.* **4**, 89–94.

Lindbeck, A.G.C., Lewandowski, D.J., Culver, J.N., Thomson, W.W. and Dawson, W.O. (1992). Mutant coat protein of tobacco mosaic virus induces acute chlorosis in expanded and developing tobacco leaves. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**, 235–241.

Lindbo, J.A. and Dougherty, W.G. (1992a). Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol. Plant Microb. Interact.* **5**, 144–153.

Lindbo, J.A. and Dougherty, W.G. (1992b). Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* **189**, 725–733.

Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M. and Dougherty, W.G. (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* **5**, 1743–1759.

Lindbo, J.A., Fitzmaurice, W.P. and della-Cioppa, G. (2001). Virus-mediated reprogramming of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 181–185.

Linstead, P.J., Hills, G.J., Plaskitt, K.A., Wilson, I.G., Harker, C.L. and Maule, A.J. (1988). The subcellular location of the gene I product of cauliflower mosaic virus is consistent with a function associated with virus spread. *J. Gen. Virol.* **69**, 1809–1818.

Linthorst, H.J.M. (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **10**, 123–150.

Linthorst, H.J.M. and Kaper, J.M. (1984). Circular satellite-RNA molecules in satellite of tobacco ringspot virus-infected tissue. *Virology* **137**, 206–210.

Linthorst, H.J.M. and Kaper, J.M. (1985). Cucumovirus satellite RNAs cannot replicate autonomously in cowpea protoplasts. *J. Gen. Virol.* **66**, 1839–1842.

Linthorst, H.J.M. Meuwissen, R.L.J., Kayffmann, S. and Bol., J.F. (1989). Constitutive expression of pathogenesis-related PR-1, GRP, and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. *Plant Cell* **1**, 285–291.

Lisa, V. and Boccardo, G. (1996). Fabaviruses: Broad bean wilt and allied viruses. In: B.D. Harrison and A.F. Murant (eds) *The Plant Viruses. Vol. 5: Polyhedral Virions and Bipartite Genomes*, pp. 229–250. Plenum Press, New York.

Lisa, V., Luisoni, E. and Milne, R.G. (1986). Carnation cryptic virus. AAB Descriptions Plant Viruses No. 315.

Lisa, V., Milne, R.G., Accotto, G.P., Boccardo, G., Caciagli, P. and Parvizy, R. (1988). Ourmia melon virus, a virus from Iran with novel properties. *Ann. Appl. Biol.* **112**, 291–302.

Lister, R.M. (1960). Transmission of soilborne virus through seed. *Virology* **10**, 547-549.

Lister, R.M. (1966). Possible relationship of virus specific products of tobacco rattle virus infections. *Virology* **28**, 350–353.

Lister, R.M. (1968). Functional relationships between virus-specific products of infection by viruses of the tobacco rattle type. *J. Gen. Virol.* **2**, 43–58.

Lister, R.M. and Murant, A.F. (1967). Seed transmission of nematode-borne viruses. *Ann. Appl. Biol.* **59**, 49–62.

Litvak, S., Tarragó, A., Tarragó-Litvak, L. and Allende, J.E. (1973). Elongation factor viral genome interaction dependent on, the aminoacylation of TYMV and TMV RNAs. *Nature (London)* **241**, 88–90.

Liu, B.L., Tabler, M. and Tsagris, M. (2000). Episomal expression of a hammerhead ribozyme directed against plum pox virus. *Virus Res.* **68**, 15–23.

Liu, H., Boulton, M.I. and Davies, J.W. (1997a). Maize streak virus coat protein binds single- and double-stranded DNA *in vitro*. *J. Gen Virol.* **78**, 1265–1270.

Liu, H., Boulton, M.I., Thomas, C.L., Ptior, D.A.M, Oparka, K.J. and Davies, J.W. (1999a). Maize streak virus coat protein is karyophyllic and facilitates nuclear transport of viral DNA. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **12**, 894–900.

Liu, H., Boulton, M.I., Oparka, K.J. and Davies, J.W. (2001). Interaction of the movement and coat proteins of maize streak virus: implications for the transport of viral DNA. *J. Gen. Virol.* **82**, 35–44.

Liu, L., Sanders, K., Thomas, C.L., Davies, J.W. and Stanley, J. (1999b). Bean yellow dwarf virus RepA, but not Rep, binds to maize retinoblastoma protein, and the virus tolerates mutations in the consensus binding motif. *Virology.* **256**, 270–279.

Liu, S., Bedford, I.D., Briddon, R.W. and Markham, P.G. (1997b). Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. *J. Gen. Virol.* **78**, 1791–1794.

Liu, S., Briddon, R.W., Bedford, I.D., Pinner, M.S. and Markham, P.G. (1998). Identification of genes directly and indirectly involved in the insect transmission of African cassava mosaic geminivirus by *Bemisia tabaci*. *Virus Genes* **18**, 5–11.

Liu, Y.H. and Symons, R.H. (1998). Specific RNA self-cleavage in coconut cadang cadang viroid: potential for a role in rolling circle replication. *RNA* **4**, 418–429.

Llave, C., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (2000). Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 13401–13406.

Lloyd, A.M., Bamason, A.R., Rogers, S.G., Byme, M.C. Fraley, R.T. and Horsch, R.B. (1986). Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* **234**, 464–466.

Lloyd, C. and Hussey, P. (2001). Microtubule-associated proteins in plants—why we need a map. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 40–47.

Lockhart, B.E. and Olszewski, N.E. (1999). Plant pararetroviruses—badnaviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1296–1300. Academic Press, San Diego.

Lockhart, B.E., Menke, J., Dahal, G. and Olszewski, N.E. (2000). Characterization and genomic analysis of tobacco vein-clearing virus, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. *J. Gen. Virol.* **81**, 1579–1585.

Lockhart, B.E.L. (1986). Purification and serology of a bacilliform virus associated with streak disease of banana. *Phytopathology* **80**, 127–131.

Lodge, J.K., Kaniewski, W.K. and Tumer, N.E. (1993). Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 7089–7093.

Loebenstein, G. and Gera, A. (1981). Inhibitor of virus replication released from tobacco mosaic virus infected protoplasts of local lesion-responding tobacco cultivar. *Virology* **114**, 132–139.

Loebenstein, G., Cohen, J., Shabtai, S., Coutts, R.H.A. and Wood, K.R. (1977). Distribution of cucumber mosaic virus in systemically infected tobacco leaves. *Virology* **81**, 117–125.

Loebenstein, G., Gera, A. and Gianinazzi, S. (1990). Constitutive production of an inhibitor of virus replication in the interspecific hybrid *Nicotiana glutinosa* × *N. debneyi*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **37**, 145–151.

Loesch-Fries, L.S and Hall, T.C. (1980). Synthesis, accumulation and encapsulation of individual brome mosaic virus RNA components in barley protoplasts. *J. Gen. Virol.* **47**, 323–332.

Loesch-Fries, L.S. and Hall, T.C. (1982). *In vivo* aminoacylation of brome mosaic and barley stripe mosaic virus RNAs. *Nature (London)* **298**, 771–773.

Loesch-Fries, L.S., Merlo, D., Zinnen, T. *et al.* (1987). Expression of alfalfa mosaic virus RNA4 in transgenic plants confers resistance. *EMBO J.* **6**, 1845–1852.

Logan, A.E. and Zettler, F.W. (1985). Rapid in vitro propagation of virus-indexed gladioli. *Acta Hortic.* **164**, 169–180.

Lommel, S.A. (1999a). Dianthoviruses (*Tombusviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 403–409. Academic Press, San Diego.

Lommel, S.A. (1999b). Machlomoviruses (*Tombusviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 935–939. Academic Press, San Diego.

Lommel, S.A., Weston-Fina, M., Xiong, Z. and Lomonossoff, G.P. (1988). The nucleotide sequence and gene organisation of red clover necrotic mosaic virus RNA2. *Nucl. Acids Res.* **16**, 8587–8602.

Lommel, S.A., Kendall, R., Sui, N.F. and Nutter, R.C. (1991). Characterization of maize chlorotic mottle virus. *Phytopathology* **81**, 819–823.

Lommel, S.A., Martelli, G.P. and Russo, M. (2000). Family *Tombusviidae*. In: M.H.V. van Regenmortel *et al.* (eds) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York.

Lomonossoff, G.P. (1995). Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**, 323–343.

Lomonossoff, G.P. and Hamilton, W.D.O. (1999). Cowpea mosaic virus-based vaccines. *Curr. Topic. Microbiol. Immunol.* **240**, 177–189.

Lomonossoff, G.P. and Johnson, J.E. (1991). The synthesis and structure of comovirus capsids. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **55**, 107–137.

Lomonossoff, G.P. and Johnson, J.E. (1995). Eukaryotic viral expression systems for polypeptides. *Semin. Virol.* **6**, 257–267.

Lomonossoff, G.P. and Johnson, J.E. (1996). Use of macromolecular assemblies as expression systems for peptides and synthetic vaccines. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 176–182.

Lomonossoff, G.P. and Shanks, M. (1983). The nucleotide sequence of cowpea mosaic virus B RNA. *EMBO J.* **2**, 2253–2258.

Lomonossoff, G.P. and Shanks, M. (1999). Comoviruses (*Comoviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 285–291. Academic Press, San Diego.

Lomonossoff, G.P. and Wilson, T.M.A. (1985). Structure and *in vitro* assembly of tobacco mosaic virus. In: J.W. Davies (ed.) *Molecular Plant Virology*, Vol. 1, pp. 43–83. CRC Press, Boca Raton.

Lomonossoff, G.P., Shanks, M. and Evans, D. (1985). The structure of cowpea mosaic virus replicative form RNA. *Virology* **144**, 351–362.

Long, D.G., Borsa, J. and Sargent, M.D. (1976). A potential artifact generated by pelleting viral particles during preparative ultracentrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* **451**, 639–642.

Loor, F. (1967). Comparative immunogenicities of tobacco mosaic virus protein subunits and reaggregated protein subunits. *Virology* **33**, 215–220.

López , G., Navas-Castello, J., Gowda, S., Moreno, P. and Flores, R. (2000). The 25-kDa protein encoded by the 3' terminal gene of citrus tristeza virus is an RNA-binding protein. *Virology* **269**, 462–470.

López, L., Urzainqui, A., Domínguez, E. and García, J.A. (2001). Identification of an N-terminal domain of the plum pox potyvirus CI RNA helicase involved in self-interaction in a yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.* **82**, 677–686.

López-Moya, J.J. and Garcia, J.A. (1999). Potyviruses (*Potyviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1369–1375. Academic Press, San Diego.

López-Moya, J.J., Wang, R.Y. and Pirone, T.P. (1999). Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *J. Gen. Virol.* **80**, 3281–3288.

Lopinski, J.D., Dinman, J.D. and Bruenn, J.A. (2000). Kinetics of ribosomal pausing during programmed –1 translational frameshifting. *Molec. Cell. Biol.* **20**, 1095–1103.

Lot, H. and Kaper, J.M. (1976). Physical and chemical differentiation of three strains of cucumber mosaic virus and peanut stunt virus. *Virology* **74**, 209–222.

Lot, H., Rubino, L., Delecolle, B., Jaquemond, M., Turturo, C. and Russo, M. (1996). Characterization, nucleotide sequence and genome organization of leek stripe virus, a putative new species of the genus Necrovirus. *Arch. Virol.* **141**, 2375–2386.

Lough, T.J., Shash, K., Xoconostle-Càzares, B. *et al.* (1998). Molecular dissection of the mechanism by which potexvirus triple gene block proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **8**, 801–814.

Louie, R. (1995). Vascular puncture of maize kernels for the mechanical transmission of maize white line mosaic virus and other viruses of maize. *Phytopathology* **85**, 139–143.

Louie, R. and Knoke, J.K. (1975). Strains of maize dwarf mosaic virus. *Plant Dis. Rep.* **59**, 518–522.

Louie, R. and Lorbeer, J.W. (1966). Mechanical transmission of onion yellow dwarf virus. *Phytopathology* **56**, 1020–1023.

Louie, R., Findley, W.R. and Knoke, J.K. (1976). Variation in resistance within corn inbred lines to infection by maize dwarf mosaic virus. *Plant Dis. Rep.* **60**, 838–842.

Louie, R., Knoke, J.K. and Reichard, D.L. (1983). Transmission of maize dwarf mosaic virus with solid-stream inoculum. *Plant Dis.* **67**, 1328–1331.

Lovisolo, O. (1985). International transport of flowers, foliage, nursery stock and ornamental plants in Europe and the Mediterranean basin. *Acta Hortic.* **164**, 139–151.

Lozoya-Saldaña, H. and Dawson, W.O. (1982). Effect of alternating temperature regimes on reduction or elimination of viruses in plant tissues. *Phytopathology* **72**, 1059–1064.

Lozoya-Saldaña, H., Abello, F. and de la Garcia, G. (1996). Electrotherapy ands shoot tip culture eliminate potato virus X in potatoes. *Am. Potato J.* **73**, 149–154.

Lu, B., Stubbs, G. and Culver, J.N. (1996). Carboxylate interactions involved in the disassembly of tobacco mosaic tobamovirus. *Virology* **225**, 11–20.

Lu, B., Taraporewala, Z.F., Stubbs, G. and Culver, J.N. (1998a). Intersubunit interactions allowing a carboxylate mutant coat protein to inhibit tobamovirus disassembly. *Virology* **244**, 13–19.

Lu, G., Zhou, Z.H., Baker, M.L. *et al.* (1998b). Structure of double-shelled rice dwarf virus. *J. Virol.* **72**, 8541–8549.

Lucas, W.J. and Gilbertson, R.L. (1994). Plasmodesmata in relation to viral movement within leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 387–411.

Lucas, W.J., Bouché-Pillon, S., Jackson, D.P. *et al.* (1995). Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* **270**, 1980–1983.

Lucknow, V.A. and Summers, M.D. (1988). Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* **167**, 56–71.

Lucy, A.P., Boulton, M.I., Davies, J.W. and Maule, A.J. (1996). Tissue specificity of *Zea mays* infection by maize streak virus. *Mol. Plant-Microb. Interact.* **9**, 22–31.

Lucy, A.P., Guo, H.-S., Li, W.-X. and Ding, S.-W. (2000). Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.* **19**, 1672–1680.

Ludueña, R.F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* **178**, 207–275.

Luhn, C.F. and Goheen, A.C. (1970). Viruses in early California grapevines. *Plant Dis. Rep.* **54**, 1055–1056.

Luisoni, E., Milne, R.G. and Boccardo, G. (1975). The maize rough dwalf virion: II. serological analysis. *Virology* **68**, 86–96.

Lukács, N. (1994). Detection of virus infection in plants and differentiation between coexisting viruses by monoclonal antibodies to double-stranded RNA. *J. Virol. Methods* **47**, 255–272.

Lundquist, R.E., Lazar, J.M., Klein, W.H. and Clark, J.M. (1972). Translation of satellite tobacco necrosis virus ribonucleic acid: II. Initiation of *in vitro* translation in prokaryotic and eukaryotic systems. *Biochemistry* **11**, 2014–2019.

Lundsgaard, T. (1992). N protein of festuca leaf streak virus (*Rhabdoviridae*) detected in cytoplasmic viroplasms by immunogold labeling. *J. Phytopathol.* **134**, 27–32.

Lundsgaard, T. (1995). Routing of the G protein during maturation of festuca leaf streak rhabdovirus in its plant host. *J. Phytopathol.* **143**, 479–483.

Lupo, R., Robino, L. and Russo, M. (1994). Immunodetection of the 33K/98K polymerase proteins in cymbidium ringspot virus-infected and in transgenic plant- tissue extracts. *Arch. Virol.* **138**, 135–142.

Lusso, M. and Kuc, J. (1996). The effect of sense and antisense expression of the PR-N gene for beta-1,3–glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. *Phys. Mol. Plant Pathol.* **49**, 267–283.

Lynch, M., Bürger, R., Butcher, D. and Gabriel, W. (1993). The mutational meltdown in asexual populations. *J. Hered.* **84**, 339–344.

MacDonald, R.J.H., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W. (1988a). Characterization of a subgenomic DNA isolated from *Triticum aestivium* plants infected with wheat dwalf virus. *J. Gen. Virol.* **69**, 1339–1344.

MacDonald, R.J.H., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W. (1988b). Priming of complementary DNA synthesis *in vitro* by small DNA molecules tightly bound to virion DNA of wheat dwarf virus. *J. Gen. Virol.* **69**, 1345–1350.

MacDowell, S.W., MacDonald, R.J.H., Hamilton, W.D.O., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W. (1985). The nucleotide sequence of cloned wheat dwarf virus DNA. *EMBO J.* **4**, 2173–2180.

MacDowell, S.W., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W. (1986). Molecular characterisation of subgenomic single-stranded and double-stranded DNA forms isolated from plants infected with tomato golden mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* **14**, 7967–7984.

MacFarlane, S.A. and Popovich, A.H. (2000). Efficient expression of foreign proteins in roots from tobravirus vectors. *Virology* **267**, 29–35.

MacFarlane, S.A., Taylor, S.C., King, D.I., Hughes, G. and Davies, J.W. (1989). Pea early browning virus RNA1 encodes four polypeptides including a putative zinc-finger protein. *Nucl. Acids Res.* **17**, 2245–2260.

MacFarlane, S.A., Brown, D.J.F. and Bol, J.F. (1995). The transmission by nematodes of tobraviruses is not determined exclusively by the viral coat protein. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**, 535–539.

MacFarlane, S.A., Wallis, C.V. and Brown, D.J.F. (1996). Multiple virus genes involved in the nematode transmission of pea early browning virus. *Virology* **219**, 417–422.

MacKenzie, D.J. and Tremaine, J.H. (1986). The use of a monoclonal antibody specific for the N-terminal region of southern bean mosaic virus as a probe of virus structure. *J. Gen. Virol.* **67**, 727–735.

MacKenzie, D.R., Cole, H., Smith, C.B. and Ercegovich, C. (1970). Effects of atrazine and maize dwarf mosaic virus infection on weight and macro and micro element constituents of maize seedlings in the greenhouse. *Phytopathology* **60**, 272–279.

MacLeod, R., Black, L.M. and Moyer, F.H. (1966). The fine structure and intracellular localisation of potato yellow dwarf virus. *Virology* **29**, 540–552.

Macnicol, P.K. (1976). Rapid metabolic changes in the wounding response of leaf discs following excision. *Plant Physiol.* **57**, 80–84.

Madden, L.V. and Campbell, C.L. (1986). Descriptions of virus disease epidemics in time and space. In: G.D. McLean, R.G. Garrett and W.G. Ruesink (eds) *Plant Virus Epidemics*, pp. 273–293. Academic Press, Orlando, FL.

Madden, L.V., Louie, R. and Knoke, J.K. (1987a). Temporal and spatial analysis of maize dwarf mosaic epidemics. *Phytopathology* **77**, 148–156.

Madden, L.V., Pirone, T.P. and Raccah, B. (1987b). Analysis of spatial patterns of virus-diseased tobacco plants. *Phytopathology* **77**, 1409–1417.

Madden, L.V., Jeger, M.J. and van den Bosch, F. (2000). A theoretical assessment of the effects of vector–virus transmission mechanism on plant virus disease epidemics. *Phytopathology* **90**, 576–594.

Madriz, J.A. de Miranda, J.R., Cabezas, E., Oliva, M., Hernandez, M. and Espinoza, A.M. (1998). Echinocloa hoja blanca and rice hoja blanca viruses occupy distinct ecological niches. *J. Phytopathol.* **146**, 305–308.

Madriz-Ordeñana, K., Rojas-Montero, R., Lundsgaard, T., Ramirez, P., Thordal-Christensen, H. and Collinge, D.B. (2000). Mechanical transmission of maize rayado fino marafivirus (MRFV) to maize and barley by means of the vascular puncture technique. *Plant Pathol.* **49**, 302–307.

Maeda, H. (1997). An atomic force microscopy study for the assembly structures of tobacco mosaic virus and their size evaluation. *Langmuir* **13**, 4150–4161.

Maeda, T. and Inouye, N. (1985). Insolubilization of cucumber mosaic virus with glutaraldehyde and its use for isolation of specific antibody. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **51**, 312–314.

Magyarosy, A.C. and Duffus, J.E. (1977). The occurrence of highly virulent strains of the beet curly top virus in California. *Plant Dis. Rep.* **61**, 248–251.

Magyarosy, A.C., Buchanan, B.B. and Schürmann, P. (1973). Effect of a systemic virus infection on chloroplast function and structure. *Virology* **55**, 426–438.

Mahajan, S.K., Chisholm, S.T., Whitham, S.A. and Carrington, J.C. (1998). Identification and characterization of a locus (*RTM1*) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14**, 177–186.

Maia, I.G., Séron, K., Haenni, A.-L. and Bernardi, F. (1996). Gene expression from viral RNA genomes. *Plant Mol. Biol.* **32**, 367–391.

Main, C.E. (1977). Crop destruction: the raison d'être of plant pathology. In: J.G. Horsfall and E.B. Cowling (eds) *Plant Disease: An Advanced Treatise*, Vol. 1, pp. 55–78. Academic Press, New York.

Main, C.E. (1983). Nature of crop losses: an overview. In: T. Kommedahl and P.H. Williams (eds) *Challenging Problems in Plant Health*, pp. 61–68. American Phytopathology Society Press, St Paul, MN.

Maisonneuve, B., Chovelon, V. and Lot, H. (1991). Inheritance of resistance to beet western yellows virus in *Lactuca virosa* L. *HortScience* **26**, 1543–1545.

Maiti, I.B. and Shepherd, R.J. (1998). Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **244**, 440–444.

Maiti, I.B., Gowda, S., Kiernan, J., Ghosh, S.K. and Shepherd, R.J. (1997). Promoter/leader deletion analysis and plant expression vectors with the figwort mosaic virus (FMV) full-length transcript (FLt) promoter containing single and double enhancer domains. *Transgen. Res.* **6**, 143–156.

Maiti, I.B., von Lanken, C., Hong, Y.L., Dey, N. and Hunt, A.G. (1999). Expression of multiple virus-derived resistance determinants in transgenic plants does not lead to additive resistance properties. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **8**, 67–73.

Mäkinen K., Næss, V., Tamm, T., Truve, E., Aaspõllu, A. and Saarma, M. (1995a). The putative replicase of the cocksfoot mottle sobemovirus is translated as part of a polyprotein by –1 ribosomal frameshift. *Virology* **207**, 566–571.

Mäkinen K., Tamm, T., Næss, V. *et al.* (1995b). Characterization of cocksfoot mottle sobemovirus genomic RNA and sequence comparison with related viruses. *J. Gen. Virol.* **76**, 2817–2825.

Mäkinen, K., Generozov, E., Arshava, N., Kaloshin, A., Morozov, S. and Zavriev, S. (2000). Detection and characterization of defective interfering RNAs associated with cocksfoot mottle sobemovirus. *Mol. Biol.* **34**, 291–296.

Malcuit, I., Marano, M.R., Kavanagh, T.A., de Jong, W., Forsyth, A. and Baulcombe, D.C. (1999). The 25-kDa movement protein of PVX elicits *Nb*-mediated hypersensitive cell death in potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 536–543.

Malcuit, I., de Jong, W., Baulcombe, D.C., Shields, D.C. and Kavanagh, T.A. (2000). Acquisition of multiple virulence/avirulence determinants by potato virus X (PVX) has occurred through convergent evolution rather than recombination. *Virus Genes* **20**, 165–172.

Maleck, K. and Dietrich, R.A. (1999). Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* **4**, 215–219.

Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H. et al. (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene or the mobile signal. Abstract W10-1, 20th Annual Meeting of the American Society for Virology.

Malyshenko, S.I., Kondakova, O.A., Nazarova, J.V., Kaplan, I.B., Taliansky, M.E. and Atabekov, J.G. (1993). Reduction in tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non-functional viral transport proteins. *J. Gen. Virol.* **74**, 1149–1156.

Mandelkow, E., Stubbs, G. and Warren, S. (1981). Structures of the helical aggregates of tobacco mosaic virus protein. *J. Mol. Biol.* **152**, 375–386.

Mandryk, M. (1963). Acquired systemic resistance to tobacco mosaic virus in *Nicotiana tabacum* evoked by stem injection with *Perenospora tabacina*. *Adam. Aust. J. Agric. Res.* **14**, 315–318.

Mang, K., Gosh, A. and Kaesberg, P. (1982). A comparative study of the cowpea and bean strains of southern bean mosaic virus. *Virology* **116**, 264–274.

Manhart, J.R. and Palmer, J.D. (1990). The gain of two chloroplast tRNA introns marks the green algal ancestors of land plants. *Nature (London)* **345**, 268–270.

Manohar, S.K., Guilley, H., Dollet, M., Richards, K. and Jonard, G. (1993). Nucleotide sequence and genetic organization of peanut clump virus RNA-2 and partial characterization of deleted forms. *Virology* **195**, 33–41.

Manoussopoulos, I.N., Maiss, E. and Tsagris, M. (2000). Native electrophoresis and Western blot analysis (NEWeB): a method for characterization of different forms of potyvirus particles and similar nucleoprotein complexes in extracts of infected plant tissues. *J. Gen. Virol.* **81**, 2295–2298.

Mansoor, S., Khan, S.H., Bashir, A. *et al.* (1999). Identification of a novel circular single-stranded DNA associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Virology* **259**, 190–199.

Manwan, I., Sama, S. and Rizvi, S.A. (1985). Use of varietal rotation in the management of tungro disease in Indonesia. Indones. *Agric. Res. Dev. J.* **7**, 43–48.

Manwan, I., Sama, S. and Rizvi, S.A. (1987). Management strategy to control rice tungro in Indonesia. In: *Proceeding of the Workshop on Rice Tungro Virus*, pp. 91–97. Ministry of Agriculture, AARD-Maros Research Institution for Food Crops, Maros, Indonesia.

Maramorosch, K. and Harris, K.F. (eds) (1981). *Plant Diseases and Vectors: Ecology and Epidemiology*. Academic Press, New York.

Maramorosch, K. and Raychaudhuri, S.P. (eds) (1988). *Mycoplasma Diseases of Crops: Basic and Applied Aspects*. Springer-Verlag, New York.

Marano, M.R. and Baulcombe, D.C. (1998). Pathogen-derived resistance targeted against the negative-strand RNA of tobacco mosaic virus: RNA strand-specific gene silencing? *Plant J.* **13**, 537–546.

Marathe, R., Anandalakshmi, R., Smith, T.H., Pruss, G.J. and Vance, V.B. (2000a). RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol.* **43**, 295–306.

Marathe, R., Smith, T.H., Anandalakshmi, R. *et al.* (2000b). Plant viral suppressors of post-transcriptional silencing do not suppress transcriptional silencing. *Plant J.* **22**, 51–59.

Marbrook, J. and Matthews, R.E.F. (1966). The differential immunogenicity of plant virus proteins and nucleoproteins. *Virology* **28**, 219–228.

Marcinka, K. and Musil, M. (1977). Disintegration of red clover mottle virus virions under different conditions of storage *in vitro*. *Acta Virol.* **21**, 71–78.

Marco, S. and Levy, D. (1979). Involvement of ethylene in the development of cucumber mosaic virus-induced chlorotic lesions in cucumber cotyledons. Physiol. *Plant Pathol.* **14**, 235–244.

Marco, S., Levy, D. and Aharoni, N. (1976). Involvement of ethylene in the suppression of hypocotyl elongation in CMV-infected cucumbers. *Physiol. Plant Pathol.* **8**, 1–7.

Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A. *et al.* (1999). Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* **89**, 805–810.

Marcos, J.F. and Beachy, R.N. (1997). Transgenic accumulation of two plant virus coat proteins on a single self-processing polypeptide. *J. Gen. Virol* **78**, 1771–1778.

Marcos, J.F. and Flores, R. (1992). Characterization of RNA specific to avocado sunblotch viroid synthesized in vitro by a cell-free system from infected avocado leaves. Virology **186**, 481–488.

Marcos, J.F., Vilar, M., Pérez-Pavá, E. and Pallás, V. (1999). *In vivo* detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the p7 putative movement protein from carnation mottle carmovirus (CarMV). *Virology* **255**, 354–365.

Margis, R., Hans, F. and Pinck, L. (1993). VPg northern-immunoblots as a means for detection of viral RNAs in protoplasts or plants infected with grapevine fanleaf nepovirus. *Archiv. Virol.* **131**, 225–232.

Marie-Jeanne, V., Ioos, R., Peyre, J., Alliot, B. and Signoret, P. (2000). Differentiation of *Poaceae* potyviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction analysis. *J. Phytopathol.* **148**, 141–151.

Marinos, N.G. (1967). Multifuntional plastids in the meristematic region of potato tuber bulbs. *J. Ultrastruct. Res.* **17**, 91–113.

Markham, P.G. (1992a). Transmission of maize streak virus by *Cicadulina* species. *XIX International Congress of Entomology*, 28 June to 4 July 1992, Beijing, China, p. 345.

Markham, P.G. (1992b). AC-electronic monitoring and its role in virus–vector relations of cicallids. *International Congress of Entomology*, 28 June to 4 July 1992, Beijing, China, p. 213.

Markham, P.G. and Hull, R. (1985). Cauliflower mosaic virus aphid transmission facilitated by transmission factors from other caulimoviruses. *J. Gen. Virol.* **66**, 921–923.

Markham, R. (1951). Physicochemical studies on the turnip yellow mosaic virus. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 221–227.

Markham, R. (1962). The analytical centrifuge as a tool for the investigation of plant viruses. *Adv. Virus Res.* **9**, 241–270.

Markham, R. and Smith, K.M. (1949). Studies on the virus of turnip yellow mosaic. *Parasitology* **39**, 330–342.

Markham, R. and Smith, J.D. (1951). Chromatographic studies on nucleic acids. IV. The nucleic acid of the turnip yellow mosaic virus, including a note on the nucleic acid of tomato bushy stunt virus. *Biochem. J.* **49**, 401–406.

Markham, R., Matthews, R.E.F. and Smith, K.M. (1948). Testing potato stocks for virus X. *Farming* February, pp. 40–46.

Markham, R., Frey, S. and Hills, G.J. (1963). Methods for enhancement of image detail and accentuation of structure in electron microscopy. *Virology* **20**, 88–102.

Markham, R., Hitchborn, J.H., Hills, G.J. and Frey, S. (1964). The anatomy of tobacco mosaic virus. *Virology* **22**, 342–359.

Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. and Winter, G. (1991). By-passing immunization: human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **222**, 581–597.

Marrou, J., Messiaen, C.-M. and Migliori, A. (1967). Méthode de contrôle de l'état sanitaire des graines de laitice. *Ann. Epiphyt.* **18**, 227–248.

Marrou, J., Quiot, J.B., Duteil, M., Labonne, G., Leclant, F. and Renoust, M. (1979). Ecology and epidemiology of cucumber mosaic virus. III. Interest of the exposure of bait plants in the study of cucumber mosaic virus dissemination. *Ann. Phytopathol.* **11**, 291-306.

Marsh, L.E. and Guilfoyle, T.J. (1987). Cauliflower mosaic virus replication intermediates are encapsidated into virion-like particles. *Virology* **161**, 129–137.

Marsh, L.E. and Hall, T.C. (1987). Evidence implicating a tRNA heritage for promoters of positive-strand RNA synthesis in brome mosaic and related viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**, 331–341.

Marsh, L.E., Dreher, T.W. and Hall, T.C. (1988). Mutational analysis of the core and modulator sequences of the BMV RNA3 subgenomic promoter. *Nucl. Acids Res.* **16**, 981–995.

Marshall, B. and Matthews, R.E.F. (1981). Okra mosaic virus protein shells in nuclei. *Virology* **110**, 253–256.

Marte, M., Buonaurio, R. and Della Torre, G. (1993). Induction of systemic resistance to tobacco powdery mildew by tobacco mosaic virus, tobacco necrosis virus and Ethephon. *J. Phytopathol.* **138**, 137–144.

Martelli, G.P. and Jelkmann, W. (1998). Foveavirus, a new plant genus. *Arch. Virol.* **143**, 1245–1249.

Martelli, G.P. and Russo, M. (1977). Plant virus inclusion bodies. *Adv. Virus Res.* **21**, 175–266.

Martelli, G.P., Di Franco, A. and Russo, M. (1984). The origin of multivesicular bodies in tomato bushy stunt virus-infected *Gomphrena globosa* plants. *J. Ultrastruct. Res.* **88**, 275–281.

Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M. et al. (2000). Family Closteroviridae. In: M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner (eds) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 943–952. Academic Press, San Diego.

Martin, A.M., Martinez-Herrera, D., Poch, H.L.C.Y. and Ponz, F. (1997a). Variability in the interactions between *Arabidopsis thaliana* ecotypes and oilseed rape mosaic tobamovirus. *Aust. J. Plant Physiol.* **24**, 275–281.

Martin, B., Collar, L.J., Tjallingii, W.F. and Fereres, A. (1997b). Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *J. Gen. Virol.* **78**, 2701–2705.

Martin, M.T. and Garcia, J.A. (1991). Plum pox potyvirus RNA replication in a crude membrane fraction from infected *Nicotiana clevelandii* leaves. *J. Gen. Virol.* **72**, 785–790.

Martin, R. (1986). Use of double-stranded RNA for detection and identification of virus diseases of *Rubus* species. *Acta Hortic.* **186**, 51–62.

Martin, R.R. (1998). Alternative strategies for engineering virus resistance in plants. Breeding for resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 121–128. APS Press, St. Paul, MN.

Martin, R.R. and Converse, R.H. (1982). An improved buffer for mechanical transmission of viruses from *Fragaria* and *Rubus*. *Acta Hortic.* **129**, 69–72.

Martin, T.J., Harvey, T.L., Bender, C.G. and Seifers, D.L. (1984). Control of wheat streak mosaic virus with vector resistânce in wheat. *Phytopathology* **74**, 963–964.

Martinez-Izquierdo, J. and Hohn, T. (1987). Cauliflower mosaic virus coat protein is phosphorylated in vitro by a virion-associated protein kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 1824–1828.

Martinez-Izquierdo, J., Fütterer, J. and Hohn, T. (1987). Protein encoded by ORF1 of cauliflower mosaic virus is part of the viral inclusion body. *Virology* **160**, 527–530.

Martinez-Soriano, J.P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C.J.M., Yucel, I., Smith, D.R. and Diener, T.O. (1996). Mexican papita viroid: putative ancestor of crop viroids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 9397–9401.

Martins, C.R.F., Johnson, J.A., Lawrence, D.M. *et al.* (1998). Sonchus yellow net rhabdovirus nuclear viroplasms contain polymerase-associated proteins. *J. Virol.* **72**, 5669–5679.

Marx, J. (2000). Interfering with gene expression. *Science* **288**, 1370–1372.

Marzachi, C., Milne, R.G. and Boccardo, G. (1988). *In vitro* synthesis of double-stranded RNA by carnation cryptic virus-associated RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **165**, 115–121.

Marzachi, C., Boccardo, G., Milne, R., Isogai, M. and Uyeda, I. (1995). Genome structure and variability of Fijiviruses. *Semin. Virol.* **6**, 103–108.

Marzachi, C., Veratti, F. and Bosco, D. (1998). Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. *Ann. Appl. Biol.* **133**, 45–54.

Más, P. and Beachy, R.N. (1998). Distribution of TMV movement protein in single living protoplasts immobilized in agarose. *Plant J.* **15**, 835–842.

Más, P. and Beachy, R.N. (1999). Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of the viral RNA. *J. Cell Biol.* **147**, 945–958.

Más, P., and Beachy, R.N. (2000). Role of microtubules in the intracellular distribution of tobacco mosaic virus movement protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 12345–12349.

Más, P. and Pallás, V. (1995). Non-isotopic tissue-printing hybridization: a new technique to study long-distance plant virus movement. *J. Virol. Methods* **52**, 317–326.

Masmoudi, K., Duby, C., Suhas, M. *et al.* (1994). Quality-control of pea seed for pea seed-borne mosaic virus. *Seed Sci. Technol.* **22**, 407–414.

Mason, W.S., Taylor, J.M. and Hull, R. (1987). Retroid virus genome replication. *Adv. Virus Res.* **32**, 35–96.

Massalski, P.R. and Harrison, B.D. (1987). Properties of monoclonal antibodies to potato leafroll luteovirus and their use to distinguish virus isolates differing in aphid transmissibility. *J. Gen. Virol.* **68**, 1813–1821.

Masuta, C. and Takanami, Y. (1989). Determination of sequence and structural requirements for pathogenicity of a cucumber mosaic virus satellite RNA (Y-satRNA). *Plant Cell* **1**, 1165–1173.

Masuta, C., Zuidema, D., Hunter, B.G., Heaton, L.A., Sopher, D.S. and Jackson, A.O. (1987). Analysis of the genome of satellite panicum mosaic virus. *Virology* **159**, 329–338.

Masuta, C., Kuwata, S. and Takanami, Y. (1988a). Disease modulation on several plants by cucumber mosaic virus satellite RNA (Y strain). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **54**, 332–336.

Masuta, C., Kuwata, S. and Takanami, Y. (1988b). Effects of extra 5′ non-viral bases on the infectivity of transcripts from a cDNA clone of satellite RNA (strain Y) of cucumber mosaic virus. *J. Biochem. (Tokyo)* **104**, 841–846.

Masuta, C., Komari, T. and Takanami, Y. (1989). Expression of cucumber mosaic virus satellite RNA from cDNA copies in transgenic tobacco plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **55**, 49–55.

Masuta, C., Kuwata, S., Matzuzaki, T., Takanami, Y. and Koiwai, A. (1992). A plant virus satellite RNA exhibits a significant sequence complementarity to a chloroplast tRNA. *Nucl. Acids Res.* **20**, 2885.

Mathon, M.P., Tavert, G. and Malato, G. (1987). Comparison of three methods for homogenising samples of plant material prior to ELISA testing. *OEPP/EPPO Bull.* **17**, 97–103.

Matisová, J. (1971). Alfalfa mosaic virus in lucerne plants and its transmission by aphids in the course of the vegetation period. *Acta Virol.* **15**, 411–420.

Matsubara, A., Kojima, M., Kawano, S. *et al.* (1985). Purification and serology of a Japanese isolate of barley yellow dwarf virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* **51**, 152–158.

Matsushita, Y., Hanazawa, K., Yoshioka, K. *et al.* (2000). *In vitro* phosphorylation of the movement protein of tomato mosaic tobravirus by a cellular kinase. *J. Gen. Virol.* **81**, 2095–2102.

Matthews, R.E.F. (1949a). Studies on potato virus X. I. Types of change in potato virus X infections. *Ann. Appl. Biol.* **36**, 448–459.

Matthews, R.E.F. (1949b). Studies on potato virus X. II. Criteria of relationships between strains. *Ann. Appl. Biol.* **36**, 460–474.

Matthews, R.E.F. (1949c). Reactions of *Cyphomandra betacea* to strains of potato virus X. *Parasitology* **39**, 241–244.

Matthews, R.E.F. (1949d). *Studies on Two Plant Viruses.* PhD thesis, University of Cambridge.

Matthews, R.E.F. (1953a). Factors affecting the production of local lesions by plant viruses. I. Effect of time of day of inoculation. *Ann. Appl. Biol.* **40**, 377–383.

Matthews, R.E.F. (1953b). Factors affecting the production of local lesions by plant viruses. II. Some effects of light, darkness and temperature. *Ann. Appl. Biol.* **40**, 556–565.

Matthews, R.E.F. (1953c). Incorporation of 8-azaguanine into nucleic acid of tobacco mosaic virus. *Nature (London)* **171**, 1065–1066.

Matthews, R.E.F. (1957). *Plant Virus Serology.* Cambridge University Press, London.

Matthews, R.E.F. (1966). Reconstitution of turnip yellow mosaic virus RNA with TMV protein subunits. *Virology* **30**, 82–96.

Matthews, R.E.F. (1970). *Plant Virology.* Academic Press, New York.

Matthews, R.E.F. (1973). Induction of disease by viruses, with special reference to turnip yellow mosaic virus. *Annu. Rev. Phytopathol.* **11**, 147–170.

Matthews, R.E.F. (1974). Some properties of TYMV nucleoproteins isolated in cesium chloride density gradients. *Virology* **60**, 54–64.

Matthews, R.E.F. (1975). A classification of virus groups based on the size of the particle in relation to genome size. *J. Gen. Virol.* **27**, 135–149.

Matthews, R.E.F. (ed.) (1979). Classification and Nomenclature of Viruses. Third Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **12**, 132–296.

Matthews, R.E.F. (1981). *Plant Virology*, 2nd edn. Academic Press, New York.

Matthews, R.E.F. (ed.) (1982). Classification and Nomenclature of Viruses. Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **17**, 1–199.

Matthews, R.E.F. (1983a). The history of viral taxonomy. In: R.E.F. Mathews (ed.) *A Critical Appraisal of Viral Taxonomy*, pp. 1–35. CRC Press, Boca Raton, FL.

Matthews, R.E.F. (1983b). Future prospects for viral taxonomy. In: R.E.F. Matthews (ed.) *A Critical Appraisal of Viral Taxonomy*, pp. 219–245. CRC Press, Boca Raton, FL.

Matthews, R.E.F. (1985a). Viral taxonomy. *Microbiol. Sci.* **2**, 74–75.

Matthews, R.E.F. (1985b). Viral taxonomy for the non-virologist. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 451–474.

Matthews, R.E.F. (1991). *Plant Virology*, 3rd edn. Academic Press, London.

Matthews, R.E.F. (ed.) (1993). *Diagnosis of Plant Virus Diseases.* CRC Press, Boca Raton, FL.

Matthews, R.E.F. and Sarkar, S. (1976). A light-induced structural change in chloroplasts of Chinese cabbage cells infected with turnip yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **33**, 435–446.

Matthews, R.E.F. and Witz, J. (1985). Uncoating of turnip yellow mosaic virus *in vivo*. *Virology* **144**, 318–327.

Matthews, R.E.F., Bolton, E.T. and Thompson, H.R. (1963). Kinetics of labelling of turnip yellow mosaic virus with ^{32}P and ^{35}S. *Virology* **19**, 179–189.

Matzke, M.A., Mette, M.F. and Matzke, A.J.M. (2000). Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol. Biol.* **43**, 401–415.

Maule, A.J. (1991). Virus movement in infected plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **9**, 457–473.

Maule, A.J. (1994). Plant-virus movement: *de novo* processing or redeployed machinery? *Trends Microbiol.* 2, 305–306.

Maule, A.J. (2000). Virus transmission—seeds. In O.C. Maloy and T.D. Murray. (eds) *Encyclopedia of Plant Pathology*, pp. 1168–1170. John Wiley and Sons, Inc.

Maule, A.J. and Wang, D. (1996). Seed transmission of plant viruses: a lesson in biological complexity. *Trends Microbiol.* **4**, 153–158.

Maule, A.J., Escaler, M. and Aranda, M.A. (2000). Programmed responses to virus replication in plants. *Mol. Plant Pathol.* **1**, 9–15.

Maurin, J., Ackermann, H.W., Lebeurier, G. and Lwoff, A. (1984). Un système des virus—1983. *Ann. Inst. Pasteur Virol.* **135E**, 105–110.

Maury, Y., Bossennec, J.-M., Boudazin, G., Hampton, R., Pietersen, G. and Macguire, J. (1987). Factors influencing ELISA evaluation of transmission of pea seed-borne mosaic virus in infected pea seed: seed-group size and seed decortication. *Agronomie* **7**, 225–230.

Maury, Y., Duby, C. and Khetarpal, R.K. (1998). Seed certification for viruses. Breeding for resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 237–248. APS Press, St. Paul, MN.

Mayer, A. (1886). Ueber die Mosaikkrankheit des Tabaks. *Landwirtsch. Vers.-Stn.* **32**, 451–467.

Mayers, C.N., Palukaitis, P. and Carr, J.P. (2000). Subcellular distribution analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. *J. Gen. Virol.* **81**, 219–226.

Maynard Smith, J. (1978). *The Evolution of Sex.* Cambridge University Press, Cambridge.

Mayo, M.A. and Brunt, A.A. (2001). The current state of plant virus taxonomy. *Molec. Plant Pathol.* **2**, 97–100.

Mayo, M.A. and D'Arcy, C.J. (1999). Family *Luteoviridae*: a reclassification of luteoviruses. In: H.G. Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp. 15–22. CAB International, Wallingford, UK.

Mayo, M.A. and Jolly, C.A. (1991). The 5'-terminal sequence of potato leafroll virus RNA: evidence of recombination between virus and host RNA. *J. Gen. Virol.* 72, 2591–2595.

Mayo, M.A. and Jones, A.T. (1999a), Nepoviruses (*Comoviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1007–1013. Academic Press, San Diego.

Mayo, M.A. and Jones, A.T. (1999b). Idaeovirus. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 809–811. Academic Press, San Diego.

Mayo, M.A. and Miller, W.A. (1999). The structure and expression of luteovirus genomes. In: H.G. Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp. 23–67. CAB International, Wallingford, UK.

Mayo, M.A. and Murant, A.F. (1999). Sequiviruses (*Sequiviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1622–1625. Academic Press, San Diego.

Mayo, M.A. and Robinson, D.J. (1996). Nepoviruses: molecular biology and replication. In: B.D. Harrison and A.F. Murant (eds) *The Plant Viruses. Vol. 5: Polyhedral Virions and Bipartite Genomes*, pp. 139–185. Plenum Press, New York.

Mayo, M.A., Barker, H. and Harrison, B.D. (1982). Specificity and properties of the genome-linked proteins of nepoviruses. *J. Gen. Virol.* **59**, 149–162.

Mayo, M.A., Berns, K.L., Fritsch, C. *et al.* (1995). Subviral agents: satellites. *Arch. Virol. Suppl.* **10**, 487–492.

Mayo, M.A., Taliansky, M.E. and Fritsch, C. (1999). Large satellite RNA: molecular parasitism or molecular symbiosis. In: P.K. Vogt and A.O. Jackson (eds) *Satellites and Defective RNAs*, pp. 65–79. Springer, Berlin.

Mayo, M.A., de Miranda, J.R., Falk, B.W., Goldbach, R., Haenni, A.-L. and Toriyama, S.(2000a). Genus Tenuivirus. In: M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner (eds) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 622–627. Academic Press, San Diego.

Mayo, M.A., Fritsch, C., Leibowitz, M.J. *et al.* (2000b). Satellite nucleic acids. In: M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop *et al.* (eds) *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on, Taxonomy of Viruses*, pp. 1028–1032. Academic Press, New York.

Mazzolini, L., Bonneville, J.M., Volovitch, M., Magazin, M. and Yot, P. (1985). Strand-specific viral DNA synthesis in purified viroplasms isolated from turnip leaves infected with cauliflower mosaic virus. *Virology* **145**, 293–303.

McCabe, P.M. and van Alfen, N.K. (1999). The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends Microbiol.* **7**, 377–381.

McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies—filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552–554.

McClements, W.L. and Kaesberg, P. (1977). Size and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Virology* **76**, 477–484.

McClure, M.A., Vasi, T.K. and Fitch, W.M. (1993). Comparative analysis of multiple protein sequence alignment methods. *Mol. Biol. Evol.* **11**, 571–592.

McCormick, A.A., Kumagai, M.H., Hanley, K. *et al.* (1999). Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 703–708.

McDaniel, L.L., Ammar, E.-D. and Gordon, D.T. (1985) Assembly, morphology and accumulation of a Hawaiian isolate of maize mosaic virus. *Phytopathology* **75**, 1167–1172.

McDonald, J.G. and Bancroft, J.B. (1977). Assembly studies on potato virus Y and its coat protein. *J. Gen. Virol.* **35**, 251–263.

McDonald, J.G. and Hiebert, E. (1974). Ultrastructure of cylindrical inclusions induced by viruses of the potato Y group as visualised by freeze-etching. *Virology* **58**, 200–208.

McDonald, J.G. and Hiebert, E. (1975). Characterization of the capsid and cylindrical inclusion proteins of three strains of turnip mosaic virus. *Virology* **63**, 295–303.

McDonald, J.G., Beveridge, T.J. and Bancroft, J.B. (1976). Self assembly of protein from a flexuous virus. *Virology* **69**, 327–331.

McElhany, P., Real, L.A. and Power, A.G. (1995). Vector preference and disease dynamics—a study of barley yellow dwarf virus. *Ecology* **76**, 444–457.

McGovern, M.H. and Kuhn, C.W. (1984). A new strain of southern bean mosaic virus derived at low temperatures. *Phytopathology* **74**, 95–99.

McGrath, P.F., Vincent, J.R., Lei, C.H. *et al.* (1997). Coat protein-mediated resistance to isolates of barley yellow dwarf in oats and barley. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**, 695–710.

McInnes, J.L., Habili, N. and Symons, R.H. (1989). Nonradioactive, photobiotin-labelled DNA probes for routine diagnosis of viroids in plant extracts. *J. Virol. Methods* **23**, 299–312.

McIntyre, J.L., Dodds, J.A. and Hare, J.D. (1981). Effects of localized infections of *Nicotiana tabacum* by tobacco mosaic virus on systemic resistance against diverse pathogens and an insect. *Phytopathology* **71**, 297–301.

McKendrick, L., Pain, V.P. and Morley, S.J. (1999). Translation initiation factor 4E. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 31–35.

McKenzie, D.R. (1983). Toward the management of crop losses. In: T. Kommedahl and P.H. Williams (eds) *Challenging Problems in Plant Health*, pp. 82–92. American Phytopathology Society Press, St Paul, MN.

McKinney, H.H. (1929). Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *J. Agric. Res.* **39**, 557–578.

McKinney, H.H. (1953). New evidence on virus disease in barley. *Plant Dis. Reptr.* **37**, 292–295.

McKinney, H.H., Silber, G. and Greeley, L.W. (1965). Longevity of some plant viruses stored in chemically dehydrated tissues. *Phytopathology* **65**, 1043–1044.

McKirdy, S.J. and Jones, R.A.C. (1994). Infection of alternate hosts associated with annual medics (*Medicago* spp.) by alfalfa mosaic virus and its persistence between growing seasons. *Aust. J. Agric. Res.* **45**, 1413–1426.

McKlusky, D.J. and Stobbs, L.W. (1985). A modified local lesion assay procedure with improved sensitivity and reproducibility. *Can. J. Plant Pathol.* 7, 347–350.

McLachlan, A.D., Bloomer, A.C. and Butler, P.J.G. (1980). Structural repeats and evolution of tobacco mosaic virus coat protein and RNA. *J. Mol. Biol.* **136**, 203–224.

McLean, B.G., Zupan, J. and Zambryski, P. (1995). Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* **7**, 2101–2114.

McLean, D.L. and Kinsey, M.G. (1984). The precibarial valve and its role in the feeding behaviour of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Bull. Entomol. Soc. Am.* **30**, 26–31.

McLean, G.B., Hempel, F.D. and Zambryski, P.C. (1997). Plant intercellular communication via plasmodesmata. *Plant Cell* **9**, 1043–1054.

McLean, G.D. and Francki, R.I.B. (1967). Purification of lettuce necrotic yellows virus by column chromatography on calcium phosphate gel. *Virology* **31**, 585–591.

McLean, G.D., Burt, J.R., Thomas, D.W. and Sproul, A.N. (1982). The use of reflective mulch to reduce the incidence of watermelon mosaic virus in Western Australia. *Crop Prot.* **1**, 491–496.

McLean, M.A., Campbell, R.N., Hamilton, R.I. and Rochon, D.M. (1994). Involvement of cucumber necrosis virus coat protein in the specificity of fungal transmission by *Olpidium bornavirus*. *Virology* **204**, 840-842.

McMullen, C.R., Gardner, W.S. and Myers, G.A. (1977). Ultrastructure of cell-wall thickenings and paramural bodies induced by barley stripe mosaic virus. *Phytopathology* **67**, 462–467.

McNaughton, P. and Matthews, R.E.F. (1971). Sedimentation of small viruses at very low concentrations. *Virology* **45**, 1–9.

McRitchie, J.J. and Alexander, L.J. (1963). Host-specific *Lycopersicon* strains of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* **53**, 394–398.

Medberry, S.L., Lockhart, B.E.L. and Olszewski, N.E. (1992). The *Commelina* yellow mottle virus promoter is a strong promoter in vascular and reproductive tissues. *Plant Cell* **4**, 185–192.

Medina, V., Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y. and Dolja, V.V. (1999). Subcellular localization of the HSP70-homolog encoded by beet yellows closterovirus. *Virology* **260**, 173–181.

Medina, V., Tian, T., Yeh, H.-H., Livieratos, C. and Falk, B.W. (2001). Lettuce infectious yellows virus-encoded P20 protein accumulates in plasmalemma deposits. Abstract W42-10, 20th Annual Meeting of the American Society for Virology.

Meinkoth, J., and Wahl, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* **138**, 267–284.

Meins, F. (2000). RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol.* **43**, 261–273.

Meints, R.H., Lee, K. and van Etten, J.L. (1986). Assembly site of the virus PBCV-1 in a *Chlorella*-like green alga: ultrastructural studies. *Virology* **154**, 240–245.

Melander, W.R. (1975). Effect of aggregation on the kinetic properties of aspartate aminotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* **410**, 74–86.

Melcher, U. (2000). The '30K' superfamily of viral movement proteins. *J. Gen. Virol.* **81**, 257–266.

Melchers, G. (1968). Techniques for the quantitative study of mutation in plant viruses. *Theor. Appl. Genet.* **38**, 275–279.

Melchers, G., Jockusch, H. and Von Sengbusch, P. (1966). A tobacco mutant with a dominant allele for hypersensitivity against some TMV strains. *Phytopathol. Z.* **55**, 86–88.

Mellema, J.E. and Amos, L.A. (1972). Three-dimensional image reconstruction of turnip yellow mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **72**, 819-822.

Mellema, J.-R., Benicourt, C., Haenni, A.-L., Noort, A., Pleij, C.W.A. and Bosch, L. (1979). Translational studies with turnip yellow mosaic virus RNAs isolated from major and minor virus particles. *Virology* **96**, 38–46.

Ménissier, J., Lebeurier, G. and Hirth, L. (1982). Free cauliflower mosaic virus supercoiled DNA in infected plants. *Virology* **117**, 322–328.

Ménissier, J., de Murcia, G., Lebeurier, G. and Hirth, L. (1983). Electron microscopic studies of the different topological forms of the cauliflower mosaic virus DNA: knotted encapsulated DNA and nuclear minichromosome. *EMBO J.* **2**, 1067–1071.

Ménissier, J., Laquel, P., Lebeurier, G. and Hirth, L. (1984). A DNA polymerase activity is associated with cauliflower mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* **12**, 8769–8778.

Ménissier, J., de Murcia, G., Geldreich, A. and Lebeurier, G. (1986). Evidence for a protein kinase activity associated with purified particles of cauliflower mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 1885–1891.

Merits, A., Guo, D. and Saarma, M. (1998). VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *J. Gen. Virol.* **79**, 3123–3127.

Merits, A., Guo, D., Järvekülg, L. and Saarma, M. (1999). Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* **263**, 15–22.

Mernaugh, R.L., Gardner, W.S. and Yocom, K.L. (1980). Three dimensional structure of pinwheel inclusions as determined by analytical geometry. *Virology* **106**, 273–281.

Mertens, P.P.C., Arella, M., Attoui, H. *et al.* (2000). Genus *Fijivirus*, genus *Phytoreovirus*, genus *Oryzavirus*. In: M. van Regenmortel *et al.* (eds) *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 455–480. Academic Press, New York.

Mesfin, T., Den Hollander, J. and Markham, P.G. (1995). Feeding activities of *Cicadulina mbila* (Hemiptera: Cicadellidae) on different host-plants. *Bull. Entomol. Res.* **85**, 387–396.

Meshi, T., Ishikawa, M., Motoyoshi, F., Semba, K. and Okada, Y. (1986). *In vitro* transcription of infectious RNAs from full-length cDNAs of tobacco mosaic virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 5043–5047.

Meshi, T., Watanabe, Y., Saito, T., Sugimoto, A., Maeda, T. and Okada, Y. (1987). Function of the 30 kD protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. *EMBO J.* **6**, 2557–2563.

Meshi, T., Motoyoshi, F., Adachi, A., Watanabe, Y., Takamatsu, N. and Okada, Y. (1988). Two concomitant base substitutions in the putative replicase genes of tobacco mosaic virus confer the ability to overcome the effects of a tomato resistance gene, *Tm-1*. *EMBO J.* **7**, 1575–1581.

Meshi, T., Motoyoshi, F., Maeda, T., Yoshiwoka, S., Watanabe, H. and Okada, Y. (1989). Mutations in the tobacco mosaic virus 30-kD protein gene overcome Tm-2 resistance in tomato. *Plant Cell* **1**, 515–522.

Mesnard, J.-M., Kirchherr, D., Wurrh, T. and Lebeurier, G. (1990). The cauliflower mosaic virus gene III product is a non-sequence-specific DNA binding protein. *Virology* **174**, 622–624.

Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matske, M.A. and Matske, A.J.M. (2000). Transcriptional silencing and promoter methy-lation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* **19**, 5194–5201.

Meulewaeter, F. (1999). Necroviruses (*Tombusviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1003–1007. Academic Press, San Diego.

Meuleweiter, F., Seurinck, J. and van Emmelo, J.(1990). Genome structure of tobacco necrosis virus A. *Virology* **117**, 699–709.

Meyer, M., Hemmer, O. and Fritsch, C. (1984). Complete nucleotide sequence of a satellite RNA of tomato black ring virus. *J. Gen. Virol.* **65**, 1575–1583.

Meyer, T.E., Cusanovich, M.A. and Kamen, M.D. (1986). Evidence against use of bacterial amino acid sequence data for construction of all-inclusive phylogenetic trees. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 217–220.

Mezitt, L.A. and Lucas, W.J. (1996). Plasmodesmatal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids. *Plant Molec. Biol.* **32**, 251–273.

Michelmore, R. (2000). Genomic approaches to plant disease resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 125–131.

Millar, A.J. (1999). Biological clocks in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **141**, 175–197.

Miller, E.D., Plante, C.A., Kim, K.-H., Brown, J.W. and Hemenway, C. (1998). Stem-loop structure in the 5′ region of potato virus X genome required for plus-strand RNA accumulation. *J. Mol. Biol.* **284**, 591–608.

Miller, W.A. (1999). Luteovirus (Luteoviridae). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 901–908. Academic Press, San Diego.

Miller, W.A. and Hall, T.C. (1983). Use of micrococcal nuclease in the purification of highly template dependent RNA-dependent RNA polymerase from brome mosaic virus-infected barley. *Virology* **125**, 236–241.

Miller, W.A., Bujarski, J.J., Dreher, T.W. and Hall, T.C. (1986). Minus-strand initiation of brome mosaic virus replicase within the 3′ tRNA-like structure of native and modified RNA templates. *J. Mol. Biol.* **187**, 537–546.

Miller, W.A., Waterhouse, P.M. and Gerlach, W.L. (1988). Sequence and organisation of barley yellow dwarf virus genomic RNA. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6097–6111.

Miller, W.A., Brown, C.M. and Wang, S. (1997a). New punctuation for the genetic code: luteovirus gene expression. *Semin. Virol.* **8**, 3–13.

Miller, W.A., Koev, G. and Mohan, B.R. (1997b). Are there risks associated with transgenic resistance to luteoviruses? *Plant Dis.* **81**, 700–710.

Milne, R.G. (1967). Plant viruses inside cells. *Sci. Prog. (Oxford)* **55**, 203–222.

Milne, R.G. (1984). Electron microscopy for the identification of plant viruses in *in vitro* preparations. *Methods Virol.* 7, 87–120.

Milne, R.G. (1988). Species concept should not be universally applied to virus taxonomy—But what to do instead? *Intervirology* **29**, 254–259.

Milne, R.G. (1991). Immunoelectron microscopy for virus identification. In: K. Mendgen and D.E. Lesemann, (eds) *Electron Microscopy of Plant Pathogens*, pp. 87–102. Springer-Verlag, New York.

Milne, R.G. (1993). Electron microscopy of *in vitro* preparations. In: R.E.F. Matthews (ed.) *Diagnosis of Plant Virus Diseases*, pp. 215–251. CRC Press, Boca Raton.

Milne, R.G. and Lesemann, D.-E. (1984). Immunoabsorbent electron microscopy in plant virus studies. *Methods Virol.* **8**, 85–101.

Milne, R.G. and Lovisolo, O. (1977). Maize rough dwarf and related viruses. *Adv. Virus Res.* **21**, 267–341.

Milne, R.G. and Luisoni, E. (1977). Rapid immune electron microscopy of virus preparations. *Methods Virol.* **6**, 265–281.

Milne, R.G. and Marzachi, C. (1999). Cryptoviruses (*Partitiviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 312–315. Academic Press, San Diego.

Milne, R.G., Conti, M. and Lisa, V. (1973). Partial purification, structure and infectivity of complete maize rough dwarf virus particles. *Virology* **53**, 130–141.

Milne, R.G., Garcia, M.L. and Grau, O. (2000). Genus Ophiovirus. In: M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop *et al.* (eds) *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 627–631. Academic Press, New York.

Mink, G.I. (1993). Pollen- and seed - transmitted viruses and viroids. *Ann. Rev. Phytopathol.* **31**, 375–402.

Mink, G.I., Wample, R. and Howell, W.E. (1998). Heat treatment of perennial plants to eliminate phytoplasmas, viruses and viroids while maintaining plant survival. Breeding for resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 332–345. APS Press, St. Paul, MN.

Miranda, G.J., Azzam, O. and Shirako, Y. (2000). Comparison of nucleotide sequences between northern and southern Philippine isolates of rice grassy stunt virus indicates occurrence of natural genetic reassortment. *Virology* **266**, 26–32.

Mirkov, T.E., Mathews, D.M., Duplessis, D.H. and Dodds, J.A. (1989). Nucleotide sequence and translation of satellite tobacco mosaic virus RNA. *Virology* **170**, 139–146.

Miroshnichenko, N.A., Karpova, O.V., Morozov, W.Y., Rodionova, N.P. and Atabekov, J.G. (1988). Translation arrest of potato virus X RNA in Krebs-2 cell-free system: RNase H cleavage promoted by complementary oligodeoxynucleotides. *FEBS Lett.* **234**, 65–68.

Missich, R., Ramirez-Parra, E. and Gutierrez, C. (2000). Relationship of oligomerization to DNA binding of wheat dwarf virus RepA and Rep proteins. *Virology* **273**, 178–188.

Mitsuhara, I., Malik, K.A., Miura, M. and Ohashi, Y. (1999). Animal cell-death suppressors Bcl-x_l and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr. Biol.* **9**, 775–778.

Mittler, R. and Lam, E. (1996). Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in plants. *Trends Microbiol.* **4**, 10–15.

Miura, K.-I., Kimura, I. and Suzuki, N. (1966). Double-stranded ribonucleic acid from rice dwarf virus. *Virology* **28**, 571–579.

Mizuno, A., Sano, T., Fujii, H., Miura, K. and Yazaki, K. (1986). Supercoiling of the genomic doublestranded RNA of rice dwarf virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 2749–2755.

Moghal, S.M. and Francki, R.I.B. (1976). Towards a system for the identification and classification of potyviruses: I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. *Virology* **73**, 350–362.

Mohier, E., Pinck, L. and Hirth, L. (1974). Replication of alfalfa mosaic virus RNAs. *Virology* **58**, 915.

Mohier, E., Hirth, L., LeMeur, M.-A. and Gerlinger, P. (1976). Analysis of alfalfa mosaic virus 17S RNA translational products. *Virology* **71**, 615–618.

Moline, H.E. and Ford, R.E. (1974). Clover yellow mosaic virus infection of seedling roots of *Pisum sativum*. *Physiol. Plant Pathol.* **4**, 219–228.

Molnar, A., Havelda, Z., Dalmay, T., Szutorisz, H. and Burgyan, J. (1997). Complete nucleotide sequence of tobacco necrosis virus strain D^H and genes required for RNA replication and virus movement. *J. Gen. Virol.* **78**, 1235–1239.

Momma, T. and Takahashi, T. (1983). Cytopathology of shoot apical meristem of hop plants infected with hop stunt viroid. *Phytopathol. Z.* **106**, 272–280.

Monette, P.L. (1986). Elimination in vitro of two grapevine nepoviruses by an alternating temperature regime. *J. Phytopathol.* **116**, 88–91.

Monis, J., Scott, H.A. and Gergerich, R.C. (1986). Effect of beetle regurgitant on plant virus transmission using the gross wounding technique. *Phytopathology* **76**, 808–811.

Montalbini, P. and Lupattelli, M. (1989). Effect of localised and systemic tobacco mosaic virus infection on some photochemical and enzymatic activities of isolated chloroplasts. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**, 147–162.

Montasser, M.S., Tousignant, M. and Kaper, J.M. (1991). Satellite-mediated protection against cucumber mosaic virus: I. Greenhouse experiments and simulated epidemic conditions in the field. *Plant Dis.* **75**, 86–92.

Montasser, M.S., Tousignant, M.E. and Kaper, J.M. (1998). Viral satellite RNAs for the prevention of cucumber mosaic virus (CMV) disease in field-grown pepper and melon plants. *Plant Dis.* **82**, 1298–1303.

Montelaro, R.C. and Rueckert, R.R. (1975). Radiolabeling of proteins and viruses *in vitro* by acetylation with radioactive acetic anhydride. *J. Biol. Chem.* **250**, 1413–1421.

Montelius, I., Liljås, L. and Unge, T. (1988). Structure of EDTA-treated satellite tobacco necrosis virus at pH 6.5. *J. Mol. Biol.* **201**, 353–363.

Moonan, F., Molina, J. and Mirkov, T.F. (2000). Sugarcane yellow leaf virus: an emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. *Virology* **269**, 156–171.

Moore, R.C. and Cyr, R.J. (2000). Association between elongation factor-1a and microtubules *in vivo* is domain dependent and conditional. *Cell Motil. Cytoskeleton* **45**, 279–292.

Moravec, T., Cerovska, N. and Pavlicek, A. (1998). Electron microscopic observation of potato virus A using murine monoclonal antibodies. *Acta. Virol.* **42**, 341–345.

Morch, M.-D., Zagorski, W. and Haenni, A.-L. (1982). Proteolytic maturation of the turnip-yellow-mosaic-virus polyprotein coded *in vitro* occurs by internal catalysis. *Eur. J. Biochem.* **127**, 259–265.

Morch, M.-D., Joshi, R.L., Denial, T.M. and Haenni, A.-L. (1987). A new 'sense' RNA approach to block viral RNA replication *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* **15**, 4123–4130.

Morch, M.-D., Boyer, J.-C. and Haenni, A.-L. (1988). Overlapping open reading frames revealed by complete nucleotide sequencing of turnip yellow mosaic virus genomic RNA. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6157–6173.

Morch, M.-D., Drugeon, G., Szafranski, P. and Haenni, A.-L. (1989). Proteolytic origin of the 15-kilodalton protein encoded by turnip yellow mosaic virus genomic RNA. *J. Virol.* **63**, 5153–5158.

Moreira, A., Jones, R.A.C. and Fribourg, C.E. (1978). A resistance breaking strain of potato virus X that does not cause local lesions in *Gomphrena globose*. *Proc. Int. Congr. Plant Pathol.*, 3rd, 1978 Abstract, p. 56.

Morel, J.-B. and Vaucheret, H. (2000). Post-transcriptional gene silencing mutants. *Plant Mol. Biol.* **43**, 275–284.

Morgunova, E.Y., Dauter, Z., Fry, E. *et al.* (1994). The atomic structure of carnation mottle virus capsid protein. *FEBS Lett.* **338**, 267–271.

Mori, K., Hosokawa, D. and Watanabe, M. (1982). Studies on multiplication and distribution of viruses in plants by the use of fluorescent antibody technique: I. Multiplication and distribution of viruses in shoot apices. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* **48**, 433–443.

Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M. and van den Heuvel, F.J.M. (1999). A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **256**, 75–84.

Morin, S., Ghanim, M., Sobol, I. And Czosnek, H. (2000). The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *Virology* **276**, 404–416.

Moriyama, H., Nitta, T. and Fukuhara, T. (1995). Double-stranded RNA in rice: a novel RNA replicon in plants. *Mol. Gen. Genet.* **248**, 364–369.

Moriyama, H., Horiuchi, H., Koga, R. and Fukuhara, T. (1999). Molecular characterization of two endogenous double-stranded RNAs in rice and their inheritance by interspecific hybrids. *J. Biol. Chem.* **274**, 6882–6888.

Morris, B.A.M., Richardson, K.A., Anderson, M.T. and Gardner, R.C. (1988a). Cassava latent virus infections mediated by the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* containing either monomeric or dimeric viral DNA. *Plant Mol. Biol.* **11**, 795–803.

Morris, B.A.M., Richardson, K.A., Haley, A., Zhan, X. and Thomas, J.E. (1992). The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA component of tobacco yellow dwarf virus reveals features of geminiviruses infecting monocotyledonous plants. *Virology* **187**, 633–642.

Morris, C., Gallois, P., Copley, J. and Kreis, M. (1988b). The 5′ flanking region of a barley B hordein gene controls tissue and developmental specific CAT expression in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* **10**, 359–366.

Morris, T.J. and Hillman, B.I. (1989). Defective interfering RNAs of a plant virus. In: *Molecular Biology of Plant–Pathogen Interactions*, pp. 185–197. Alan R. Liss, New York.

Mosch, W.H.M., Huttings, H. and Rast, A.T.B. (1973). Some chemical and physical properties of 18 tobacco mosaic virus isolates from tomato. *Neth. J. Plant Pathol.* **79**, 104–111.

Mossop, D.W. and Francki, R.I.B. (1977). Association of RNA3 with aphid transmission of cucumber mosaic virus. *Virology* **81**, 177–181.

Mossop, D.W. and Francki, R.I.B. (1978). Survival of a satellite RNA *in vivo* and its dependence on cucumber mosaic virus for replication. *Virology* **86**, 562–566.

Mossop, D.W. and Francki, R.I.B. (1979a). The stability of satellite viral RNAs *in vivo* and *in vitro*. *Virology* **94**, 243–253.

Mossop, D.W. and Francki, R.I.B. (1979b). Comparative studies on two satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Virology* **95**, 395–404.

Motoyoshi, F. and Hull, R. (1974). The infection of tobacco protoplasts with pea enation mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **24**, 89–99.

Motoyoshi, F. and Oshima, N. (1975). Infection with tobacco mosaic virus of leaf mesophyll protoplasts from susceptible and resistant lines of tomato. *J. Gen. Virol.* **29**, 81–91.

Motoyoshi, F. and Oshima, N. (1976). The use of tris-HCl buffer for inoculation of tomato protoplasts with tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **32**, 311–314.

Motoyoshi, F. and Oshima, N. (1977). Expression of genetically controlled resistance to tobacco mosaic virus infection in isolated tomato leaf mesophyll protoplasts. *J. Gen. Virol.* **34**, 499–506.

Mouches, C., Candresse, T. and Bové, J.M. (1984). Turnip yellow mosaic virus RNA-replicase contains host and virus-encoded subunits. *Virology* **134**, 78–90.

Mougeot, J., Guidasci, T., Wurch, T., Lebeurier, G. and Mesnard, J. (1993). Identification of C-terminal amino acid residues of cauliflower mosaic virus open reading frame III protein responsible for its DNA binding activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 1470–1473.

Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T. *et al.* (2000). *Arabidopsis SGS2* and *SGS3* genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**, 533–542.

Moya, A., Rodriguez-Cerezo, E. and García-Arenal, F. (1993). Genetic structure of natural populations of the plant RNA virus tobacco mild green mosaic virus. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 449–456.

Moyer, J.W. (1999). Tospoviruses (*Bunyaviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1803–1807. Academic Press, San Diego.

Mueller, E., Gilbert, J.E., Davenport, G., Brigneti, G. and Baulcombe, D.C. (1995). Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant J.* **7**, 1011–1013.

Mühlbach, H.-P. and Sänger, H.L. (1979). Viroid replication is inhibited by α-amantin. *Nature (Lond.)* **278**, 185–187.

Mukhopadhyay, S. and Chowdhury, A.K., (1973). Some epidemiological aspects of tungro virus disease of rice in West Bengal. *Int. Rice Commun. Newsl.* **22**, 44–57.

Muller, G.W. and Costa, A.S. (1987). Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization. *Phytophylactica* **19**, 197–198.

Muller, H.J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res.* **1**, 2–9.

Müller, H.O. (1942). Die Ausmessung der Tiefe übermikroskopischer Objekte. *Kolloid-Z.* **99**(1), 6–28; *Chem. Abstr.* **37**, 3991 (1943).

Müller, K.O. and Munro, J. (1951). The reaction of virus-infected potato plants to *Phytophthora infestans*. *Ann. Appl. Biol.* **38**, 765–773.

Mullin, R.H., Smith, S.H., Frazier, N.W., Schlegel, D.E. and McCall, S.R. (1974). Meristem culture frees strawberries of mild yellow edge, pallidosis and mottle diseases. *Phytopathology* **64**, 1425–1429.

Mullineaux, P.M., Donson, J., Morris-Krsinich, B.A.M., Boulton, M.I. and Davies, J.W. (1984). The nucleotide sequence of maize streak virus DNA. *EMBO J.* **3**, 3063–3068.

Mullineaux, P.M., Donson, J., Stanley, J. *et al.* (1985). Computer analysis identifies sequence homologies between potential gene products of maize streak virus and those of cassava latent virus and tomato golden mosaic virus. *Plant Mol. Biol.* **5**, 125–131.

Mullineaux, P.M., Guerineau, F. and accotto, G.P. (1990). Processing of complementary sense RNAs of *Digitaria* streak virus in its host and in transgenic tobacco. *Nucl. Acids Res.* **18**, 7259–7265.

Mullineaux, P.M., Davies, J.W. and Woolston, C.J. (1992). Geminiviruses as gene vectors. In: T.M.A. Wilson and J.W. Davies (eds) *Genetic Engineering with Plant Viruses*, pp. 187–215. CRC Press, Boca Raton, FL.

Mullineaux, P.M., Rigden, J.E., Dry, I.B., Krake, L.R. and Rezaian, M.A. (1993). Mapping of the polycistronic RNAs of tomato leaf curl geminivirus. *Virology* **193**, 414–423.

Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T. and Erlich, H.A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*; the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263–273.

Mumford, D.L. (1972). A new method of mechanically transmitting curly top virus. *Phytopathology* **62**, 1217–1218.

Mumford, D.L. and Thornley, W.R. (1977). Location of curly top virus antigen in bean, sugarbeet, tobacco, and tomato by fluorescent antibody staining. *Phytopathology* **67**, 1313–1316.

Mundry, K.W. (1957). Die abhängigkeit des auftretens neuer virusstämme von der kulturetemperatur der wirtspflanzen. Z. Indukt. *Abstamm. Vererbungsi.* **88**, 407–426.

Mundry, K.W., Watkins, P.A.C., Ashfield, T., Plaskitt, K.A., Eiselawalter, S. and Wilson, T.M.A. (1991). Complete uncoating of the 5′ leader sequence of tobacco mosaic virus RNA occurs rapidly and is required to initiate cotranslational disassembly *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **72**, 769–777.

Murakishi, H.H. (1963). Transfer of virus by a direct leaf-to-leaf method. *Nature (Lond.)* **198**, 312–313.

Murakishi, H.H. and Carlson, P.S. (1976). Regeneration of virus-free plants from dark-green islands of tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Phytopathology* **66**, 931–932.

Murakishi, H.H., Hartmann, J.X., Beachy, R.N. and Pelcher, L.E. (1971). Growth curve and yield of tobacco mosaic virus in tobacco callus cells. *Virology* **43**, 62–68.

Murakishi, H.H., Lesney, M. and Carlson, P. (1984). Protoplasts and plant viruses. *Adv. Cell Cult.* **3**, 1–55.

Murant, A.F. (1981). Nepoviruses. In: E. Kurstak (ed.) *Handbook of Plant Virus Infections: Comparative Diagnosis*, pp. 197–238. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Murant, A.F. (1984). Helper dependence among persistent and semi-persistent aphid-borne viruses. *Phytoparasitica* **12**, 207.

Murant, A.F. (1990). Dependence of groundnut rosette virus on its satellite RNA as well as on groundnut rosette assistor luteovirus for transmission by *Aphis craccivora*. *J. Gen. Virol.* **71**, 2163–2166.

Murant, A.F. and Kumar, I.K. (1990). Different variants of the satellite RNA from groundnut rosette virus are responsible for the chlorotic and green forms of groundnut rosette disease. *Ann. Appl. Biol.* **117**, 85–92.

Murant, A.F. and Lister, R.M. (1967). Seed-transmission in the ecology of nematode-borne viruses. *Ann. Appl. Biol.* **59**, 63–76.

Murant, A.F. and Mayo, M.A. (1982). Satellites of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **20**, 49–70.

Murant, A.F. and Taylor, C.E. (1965). Treatment of soil with chemicals to prevent transmission of tomato black ring and raspberry ringspot viruses by *Longidorus elongatus* (de Man). *Ann. Appl. Biol.* **55**, 227–237.

Murant, A.F., Mayo, M.A., Harrison, B.D. and Goold, R.A. (1973). Evidence for two functional RNA species and a 'satellite' RNA in tomato blackring virus. *J. Gen. Virol.* **19**, 275–278.

Murant, A.F., Chambers, J. and Jones, A.T. (1974). Spread of raspberry bushy dwarf virus by pollination, its association with crumbly fruit and problems of control. *Ann. Appl. Biol.* **77**, 271–281.

Murant, A.F., Taylor, M., Duncan, G.H. and Raschké, J.H. (1981). Improved estimates of molecular weight of plant virus RNA by agarose gel electrophoresis and electron microscopy after denaturation with glyoxal. *J. Gen. Virol.* **53**, 321–332.

Murant, A.F., Mayo, M.A. and Raschké, J.H. (1986). Some biochemical properties of raspberry bushy dwarf virus. *Acta Hortic.* **186**, 23–30.

Murant, A.F., Rajeshwari, R., Robinson, D.J. and Raschké, J.H. (1988a). A satellite RNA of groundnut rosette virus that is largely responsible for symptoms of groundnut rosette disease. *J. Gen. Virol.* **69**, 1479–1486.

Murant, A.F., Raccah, B. and Pirone, T.P. (1988b). Transmission by vectors. In: R.G. Milne (ed.) *The Plant Viruses*, Vol. **4**, *The Filamentous Plant Viruses*, pp. 237–273. Plenum, New York.

Murant, A.F., Jones, A.T., Martelli, G.P. and Stace-Smith, R. (1996). Nepoviruses: general properties, diseases, and virus identification. In: B.D. Harrison and A.F. Murant (eds) *The Plant Viruses. Vol. 5: Polyhedral Viruses and Bipartite RNA Genomes*, pp. 99–137. Plenum Press, New York.

Murdock, D.J., Nelson, P.E. and Smith, S.H. (1976). Histopathological examination of *Pelargonium* infected with tomato ringspot virus. *Phytopathology* **66**, 844–850.

Murillo, I., Cavallarin, L. and San Segundo, B. (1997). The maize pathogenesis-related PRms protein localizes to plasmodesmata in maize radicles. *Plant Cell* **9**, 145–156.

Muro-Cacho, C.A. (1999). *In situ* polymerase chain reaction: overview of procedures and applications. *Pediatr. Pathol. Mol. Med.* **18**, 231–253.

Murphy, A.M., Chivasa, S., Singh, D.P. and Carr, J.P. (1999a). Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends Plant Sci.* **4**, 155–160.

Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop *et al.* (eds) (1995). Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, Wien, New York.

Murphy, J.F., Rychlik, W., Rhoads, R.E., Hunt, A.G. and Shaw, J.G. (1991). A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links to the viral RNA. *J. Virol.* **65**, 511–513.

Murphy, J.F., Klein, P.G., Hunt, A.G. and Shaw, J.G. (1996). Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology* **220**, 535–538.

Murphy, J.F., Andrianifahanana, M. and Sikora, E.J. (1999b). Detection of cucumber mosaic cucumovirus in weed species: a cautionary report on nonspecific reactions in ELISA. *Can J. Plant Pathol.* **21**, 338–344.

Murphy, J.F., Zehnder, G.W., Schuster, D.J., Sikora, E.J., Polston, J.E. and Kloepper, J.W. (2000). Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection of tomato against tomato mottle virus. *Plant Dis.* **84**, 779–784.

Mutterer, J.D., Stussi-Garaud, C., Milcher, P., Richards, K.E., Jonard, G. and Ziegler-Graff, V. (1999). Role of the beet western yellows virus readthrough protein in virus movement in *Nicotaina clevelandii*. *J. Gen. Virol.* **80**, 2771–2778.

Nagaich, B.B., Upadhya, M.D., Prakash, O. and Singh, S.J. (1968). Cytoplasmically determined expression of symptoms of potato virus X crosses between species of *Capsicum*. *Nature (Lond.)* **220**, 1341–1342.

Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K., Hanley-Bowdoin, L. and Robertson, D. (1995). A geminivirus induces expression of a host DNA replication protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7, 705–719.

Nagaraj, A.N. (1965). Immunofluorescence studies on synthesis and distribution of tobacco mosaic virus antigen in tobacco. *Virology* **25**, 133–142.

Nagaraj, A.N. and Black, L.M. (1961). Localisation of wound-tumor virus antigen in plant tumors by the use of fluorescent antibodies. *Virology* **15**, 289–294.

Nagata, T. (1999). *Competence and Specificity of Thrips in the Transmission of Tomato Spotted Wilt Virus*. PhD thesis, University of Wageningen.

Nagata, T., InoueNagata, A.K., Prins, M., Goldbach, R. and Peters, D. (2000). Impeded thrips transmission of defective tomato spotted wilt virus isolates. *Phytopathology*. **90**, 454–459.

Nagy, F., Odell, J., Morelli, G. and Chua, N. (1986). Properties of expression of the 35S promoter from CaMV in transgenic tobacco plants. In: M. Zaitlin, P. Day and A. Hollaender (eds) *Biotechnology in Plant Science*, pp. 227–236. Academic Press, Orlando, FL.

Nagy, P.D. and Bujarski, J.J. (1993). Targetting the site of RNA–RNA recombination in brome mosaic virus with antisense sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 6390–6394.

Nagy, P.D. and Bujarski, J.J. (1995). Efficient system of homologous RNA recombination in brome mosaic virus: sequence and structure requirements and accuracy of crossovers. *J. Virol.* **69**, 131–140.

Nagy, P.D. and Bujarski, J.J. (1996). Homologous RNA recombination of brome mosaic virus: AU-rich regions decrease the accuracy of crossovers. *J. Virol.* **70**, 415–426.

Nagy, P.D. and Bujarski, J.J. (1997). Engineering of homologous recombination hotspots with AU-rich sequences in brome mosaic virus: AU-rich sequences decrease the accuracy of crossovers. *J. Virol.* **71**, 3799–3810.

Nagy, P.D. and Bujarski, J.J. (1998). Silencing homologous recombination hotspots with GC-rich sequences in brome mosaic virus. *J. Virol.* **72**, 1122–1130.

Nagy, P.D. and Simon, A.E. (1997). New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* **235**, 1–9.

Nagy, P.D., Dzianott, A., Ahlquist, P.G. and Bujarski, J.J. (1995). Mutations in the helicase-like domain of protein 1a alter the sites of RNA-RNA recombination in brome mosaic virus. *J. Virol.* **69**, 2547–2556.

Nagy, P.D., Carpenter, C.D. and Symon, A.E. (1997). A novel 3′ end repair mechanism in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1113–1118.

Nagy, P.D., Ogiela, C. and Bujarski, J.J. (1999). Mapping sequences active in homologous RNA recombination in brome mosaic virus: prediction of recombination hot spots. *Virology* **254**, 92–104.

Naidu, R.A., Krishnan, M., Nayudu, M.V. and Gnanam, A. (1986) Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves: III. Changes in the polypeptides of photosystem II particles. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **29**, 53–58.

Nakashima, N. and Noda, H. (1995). Nonpathogenic *Niloparvata lugens* reovirus is transmitted to the brown planthopper through rice plant. *Virology* **207**, 303–307.

Nakashima, N., Koizumi, M., Watanabe, H. and Noda, H. (1996). Complete nucleotide sequence of the Niloparvata-lugens reovirus—a putative member of the genus Fijivirus. *J. Gen. Virol.* **77**, 139–146.

Namba, K. and Stubbs, G. (1986). Structure of tobacco mosaic virus at 3.6 Å resolution: implications for assembly. *Science* **231**, 1401–1406.

Namba, K., Caspar, D.L.D. and Stubbs, G. (1984). Computer graphics representation of levels of organization in tobacco mosaic virus structure. *Science* **227**, 773–776.

Namba, K., Caspar, D.L.D. and Stubbs, G. (1988). Enhancement and simplification of macromolecular images. *Biophys. J.* **53**, 469–475.

Namba, K., Pattanayek, R. and Stubbs, G. (1989). Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus: refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fibre diffraction. *J. Mol. Biol.* **208**, 307–325.

Nameth, S.T. and Dodds, J.A. (1985). Double-stranded RNAs detected in cucurbit varieties not inoculated with viruses. *Phytopathology* **75**, 1293.

Nameth, S.T., Dodds, J.A., Paulus, A.O. and Laemmien, F.F. (1986). Cucurbit viruses of California: an ever-changing problem. *Plant Dis.* **70**, 8–11.

Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R.A. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279–289.

Napuli, A.J., Falk, B.W. and Dolja, V.V. (2000). Interaction between the HSP70 homolog and filamentous virion of beet yellows virus. *Virology* **274**, 232–239.

Naqvi, S.M.S., Park, K.S., Yi, S.Y., Lee, H.W., Bok, S.H. and Choi, D. (1998). A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response following tobacco mosaic virus infection in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 37, 571–576.

Nassuth, A., Alblas, F. and Bol, J.F. (1981). Localisation of genetic information involved in the replication of alfalfa mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **53**, 207–214.

Nassuth, A., Ten Bruggencate, G. and Bol, J.F. (1983a). Time course of alfalfa mosaic virus RNA and coat protein synthesis in cowpea protoplasts. *Virology* **125**, 75–84.

Nassuth, A., Alblas, F., van der Geest, A.J.M. and Bol, J.F. (1983b). Inhibition of alfalfa mosaic virus RNA and protein synthesis by actinomycin D and cycloheximide. *Virology* **126**, 517–524.

Nathanson, N., McGann, K.A. and Wilesmith, J. (1995). The evolution of virus diseases: their emergence, epidemicity and control. In: A.J. Gibbs, C.H. Calisher and F. García-Arenal (eds) *Molecular Basis for Virus Evolution*, pp.31–46. Cambridge University Press, Cambridge.

Nault, L.R. (1987). Origin and evolution of *Auchenorrhyncha*-transmitted, plant infecting viruses. In: M.R. Wilson and L.R. Nault (eds) *Leafhoppers and Plant Hoppers of Economic Importance*, Proceedings of the Second Workshop, pp. 131–149. CIE, London.

Nault, L.R. (1991). Transmission biology, vector specificity and evolution of planthopper transmitted plant viruses. In: R.F. Denno and T.J. Perfect (eds) *Planthoppers. Their Ecology, Genetics and Management*,. Chapman and Hall, New York.

Nault, L.R. (1997). Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **90**, 521–541.

Nault, L.R. and Ammar, E.D. (1989). Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Entomol.* **34**, 503–529.

Nault, L.R. and Madden, L.V. (1988). Phylogenetic relatedness of maize chlorotic dwarf virus leafhopper vectors. *Phytopathology* **78**, 1683–1687.

Nault, L.R. and Styer, W.E. (1970). An *Aceria tulipae*-borne disease agent producing a virus-like disease of Graminae. *Phytopathology* **59**, 1042.

Nault, L.R. and Styer, W.E. (1972). Effects of sinigrin on host selection by aphids. *Entomol. Exp. Appl.* **15**, 423–437.

Navarro, B. and Flores, R. (1997). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 11262–11267.

Navarro, J.A. and Flores, R. (2000). Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J.* **19**, 2662–2670.

Navarro, J.A., Daros, J.A. and Flores, R. (1999). Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology* **253**, 77–85.

Navarro, J.A., Vera, A. and Flores, R. (2000). A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of *Avocado sunblotch viroid*. *Virology* **268**, 218–225.

Navarro, L., Llacer, G., Cambra, M., Arregui, J.M. and Juarez, J. (1983). Shoot-tip grafting *in vitro* for elimination of viruses in peach plants (*Prunus persica* Batsch). *Acta Hortic.* **130**, 185–192.

Naylor, M., Murphy, A.M., Berry, J.O. and Carr, J.P. (1998). Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 860–868.

Ndowora, T., Dahal, G., LaFleur, D. *et al.* (1999). Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* **255**, 214–220.

Neeleman, L. and Bol, J.F. (1999). *Cis*-acting functions of alfalfa mosaic virus proteins involved in replication and encapsidation of viral RNA. *Virology* **254**, 324–333.

Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

Nejidat, A. and Beachy, R.N. (1989). Decreased levels of TMV coat protein in transgenic tobacco plants at elevated temperatures reduce resistance to TMV infection. *Virology* **173**, 531–538.

Nejidat, A. and Beachy, R.N. (1990). Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses. *Mol. Plant Microbe Interact.* **3**, 247–251.

Nelson, R.S. and van Bel, A.J.E. (1998). The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. *Progr. Bot.* **59**, 476–533.

Nelson, R.S., Powell Abel, P. and Beachy, R.N. (1987). Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus. *Virology* **158**, 126–132.

Nelson, R.S., McCormick, S.M., Delannay, X. *et al.* (1988). Virus tolerance, plant growth and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Biotechnology* **6**, 403–409.

Newcomb, E.H. (1967). Fine structure of protein storing plastids in bean root tips. *J. Cell Biol.* **33**, 143–163.

Ng, J. and Perry, K.L. (1999). Stability of the aphid transmission phenotype in cucumber mosaic virus. *Plant Pathol.* **48**, 388–394.

Niblett, C.L. and Paulsen, A.Q. (1975). Purification and further characterization of panicum mosaic virus. *Phytopathology* **65**, 1157–1160.

Niblett, C.L., Dickson, E., Fernow, K.H., Horst, R.K. and Zaitlin, M. (1978). Cross protection among four viroids. *Virology* **91**, 198–203.

Nickerson, K.W. and Lane, L.C. (1977). Polyamine content of several RNA plant viruses. *Virology* **81**, 455–459.

Niepel, M. and Gallie, D.R. (1999). Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *J. Virol.* **73**, 9080–9088.

Nikovics, K., Simidjieva, J., Peres, A., *et al.* (2001). Cell-cycle, phase-specific activation of maize streak virus promoters. *Molec. Plant Microb. Interact.* **14**, 609–617.

Nilsson-Tiligren, T., Kolehmainen-Sevéus, L., and von Wettstein, D. (1969). Studies on the biosynthesis of TMV: I. A system approaching a synchronized virus synthesis in a tobacco leaf. *Mol. Gen. Genet.* **104**, 124–141.

Nishiguchi, M. and Motoyoshi, F. (1987). Resistance mechanisms of tobacco mosaic virus strains in tomato and tobacco. In: D. Evered and S. Harnett (eds) *Plant Resistance to Viruses*, pp. 38–56. Wiley, Chichester.

Nishiguchi, M., Motoyoshi, F. and Oshima, N. (1978). Behavior of a temperature-sensitive strain of tobacco mosaic virus in tomato leaves and protoplasts. *J. Gen. Virol.* **39**, 53–61.

Nishiguchi, M., Motoyoshi, F. and Oshima, N. (1980). Further investigation of a temperature-sensitive strain of tobacco mosaic virus: its behaviour in tomato leaf epidermis. *J. Gen. Virol.* **46**, 497–5000.

Nishiguchi, M., Kikuchi, S., Kiho, Y., Ohno, T., Meshi, T. and Okada, Y. (1985). Molecular basis of plant viral virulence: the complete nucleotide sequence of an attenuated strain of tobacco mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* **13**, 5585–5590.

Nishiguchi, M., Langridge, W.H.R., Szalay, A.A. and Zaitlin, M. (1986). Electroporation-mediated infection of tobacco leaf protoplasts with tobacco mosaic virus RNA and cucumber mosaic virus RNA. *Plant Cell Rep.* **5**, 57–60.

Niswender, C.M. (1998). Recent advances in mammalian RNA editing. *Cell. Molec. Life Sci.* **54**, 946–964.

Nitta, N., Takanami, Y., Kuwata, S. and Kubo, S. (1988). Inoculation with RNAs 1 and 2 of cucumber mosaic virus induces viral RNA replicase activity in tobacco mesophyll protoplasts. *J. Gen. Virol.* **69**, 2695–2700.

Nixon, H.L. and Gibbs, A.J. (1960). Electron microscope observations on the structure of turnip yellow mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **2**, 197–200.

Noad, R.J., Al-Kaff, N.S., Turner, D.S. and Covey, S.N. (1998). Analysis of polypurine tract-associated DNA plus-strand priming *in vivo* utilizing a plant pararetroviral vector carrying redundant ectopic priming elements. *J. Biol. Chem.* **273**, 32568–32575.

Noort, A., van den Drics, C.L.A.M., Pleij, C.W.A., Jaspars, E.M.J. and Bosch, L. (1982). Properties of turnip yellow mosaic virus in cesium chloride solutions: the formation of high-density components. *Virology* **120**, 412–421.

Norris, E., Vaira, A.M., Caciagli, P., Masenga, V., Gronenborn, B. and Accotto, G.P. (1998). Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *J. Virol.* **72**, 10050–10057.

Novik, R.P. (1998). Contrasting lifestyles of rolling-circle phages and plasmids. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 434–438.

Nuorteva, P. (1962). Studies on the causes of the phytopathogenicity of *Calligypona pellucida* (F). Hom. Araeopidae). *Ann. Zool. Soc. Zool. Bot. Fenn. Vanamo* **23**(4), 1–58.

Nurkiyanova, K.M., Ryabov, E.V., Commandeur, U., Duncan, G.H., Canto, T., Gray, S.M., Mayo, M.A. and Taliansky, M.E. (2000). Tagging potato leafroll virus with the jellyfish green fluorescent protein gene. *J. Gen. Virol.* **81**, 617–626.

Nuss, D.L. (1999). Hypoviruses (*Hypoviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 804–807. Academic Press, San Diego.

Nuss, D.L. and Koltin, V. (1990). Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**, 37–58

Nuss, D.L. and Peterson, A.J. (1981). Resolution and genome assignment of mRNA transcripts synthetized *in vitro* by wound tumor virus. *Virology* **114**, 399–404.

Nuss, D.L. and Summers, D. (1984). Variant dsRNAs associated with transmission-defective isolates of wound tumor virus represent terminally conserved remnants of genome segments. *Virology* **133**, 276–288.

Nutter, F.W. (1997). Quantifying the temporal dynamics of plant virus epidemics: a review. *Crop Protect.* **16**, 603–618.

Nutter, F.W., Teng, P.S. and Royer, M.H. (1993). Terms and concepts for yield, crop loss, and disease thresholds. *Plant Dis.* **77**, 211–215.

O'Donnell, I.J., Shukla, D.D. and Gough, K.H. (1982). Electro-blot radioimmunoassay of virus-infected plant sap—a powerful new technique for detecting plant viruses. *J. Virol. Methods* **4**, 19–26.

O'Loughlin, G.T. and Chambers, T.C. (1967). The systemic infection of an aphid by a plant virus. *Virology* **33**, 262–271.

O'Reilly, E.K. and Kao, C.C. (1998). Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer prediction of secondary structure. *Virology* **252**, 287–303.

O'Reilly, E.K., Tang, N., Ahlquist, P. and Kao, C.C. (1995). Biochemical and genetic analysis of the interaction between the helicase-like and polymerase-like proteins of brome mosaic virus. *Virology* **214**, 59–71.

O'Reilly, E.K., Paul, J.D. and Kao, C.C. (1997). Analysis of the interaction of viral RNA replication proteins by using the yeast two-hybrid assay. *J. Virol.* **71**, 7526–7532.

O'Reilly, E.K., Wang, Z., French, R. and Kao, C.C. (1998). Interactions between the structural domains of the RNA replication proteins of plant-infecting RNA viruses. *J. Virol.* **72**, 7160–7169.

Oakley, B.R. (2000). An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.* **10**, 537–542.

Oberschmidt, O., Hücking, C. and Piechulla, B. (1995). Diurnal *Lhc* gene expression is present in many but not all species of the plant kingdom. *Plant Mol. Biol.* **27**, 147–153.

Oda, Y., Saeki, K., Takahashi, Y. *et al.* (2000). Crystal structure of tobacco necrosis virus at 2.25 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **300**, 153–169.

Odell, J.T. and Howell, S.H. (1980). The identification, mapping, and characterization of mRNA for P66, a cauliflower mosaic virus-coded protein. *Virology* **102**, 349–359.

Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature (London)* **313**, 810–812.

Odumosu, A.O., Homer, R.B. and Hull, R. (1981). Circular dichroism studies on Southern bean mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **53**, 193–196.

Offei, S.K., Coffin, R.S. and Coutts, R.H.A. (1995). The tobacco necrosis virus p7a protein is a nucleic acid-binding protein. *J. Gen. Virol.* **76**, 1493–1496.

Offord, R.E. (1966). Electron microscopic observations on the substructure of tobacco rattle virus. *J. Mol. Biol.* **17**, 370–375.

Ofori, F.A. and Francki, R.I.B. (1983). Evidence that maize wallaby ear disease is caused by an insect toxin. *Ann. Appl. Biol.* **103**, 185–189.

Ofori,, F.A. and Francki, R.I.B. (1985). Transmission of leafhopper A virus, vertically through eggs and horizontally through maize in which it does not multiply. *Virology* **144**, 152–157.

Ogawa, M. and Sakai, F. (1984). A messenger RNA for tobacco mosaic virus coat protein in infected tobacco mesophyll protoplasts. *Phytopathol. Z.* **109**, 193–203.

Oh, C-S. and Carrington, J.C. (1989). Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-Pro by site-directed mutagenesis. *Virology* **173**, 692–699.

Oh, J.-W., Kong, Q., Song, C., Carpenter, C.D. and Simon, A.E. (1995). Open reading frames of turnip crinkle virus involved in satellite symptom expression and incompatibility with *Arabidopsis thaliana* ecotype Dijon. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**, 979–987.

Ohki, S.T. and Inouye, T. (1987). Use of Gelrite as a gelling agent in immunodiffusion test for identification of plant viral antigens. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **53**, 557–561.

Ohki, S.T., Leps, W.T. and Hiruki, C. (1986). Effects of alfalfa mosaic virus infection on factors associated with symbiotic N_2 fixation in alfalfa. *Can. J. Plant Pathol.* **8**, 277–281.

Ohno, T., Takamatsu, N., Meshi, T., Okada, Y., Nishiguchi, M. and Kiho, Y. (1983). Single amino acid substitution in 30K protein of TMV defective in virus transport function. *Virology* **131**, 255–258.

Okada, Y. (1986a). Cucumber green mottle mosaic virus. In: M.H.V. van Regenmortel and H. Fraenkel-Conrat (eds) *The Plant Viruses*, Vol. 1, pp. 267–281. Plenum, New York.

Okada, Y. (1986b). Molecular assembly of tobacco mosaic virus *in vitro*. *Adv. Biophys.* **22**, 95–149.

Okada, Y. (1999). Historical overview of research on tobacco mosaic virus genome: genome organization, infectivity and gene manipulation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **354**, 569–582.

Okada, Y., Ohashi, Y., Ohno, T. and Nozu, Y. (1970). Sequential reconstitution of tobacco mosaic virus. *Virology* **42**, 243–245.

Okuno, T. and Furusawa, I. (1979). RNA polymerase activity and protein synthesis in brome mosaic virus-infected protoplasts. *Virology* **99**, 218–225.

Old, R.W. and Primrose, S.B. (1989). Principles of genetic manipulation. 4th Edn. Blackwell Scientific Publications.

Ollennu, N.E., Owusa, G.K. and Thresh, J.M. (1989). Spread of cacao swollen shoot virus to recent plantings in Ghana. *Crop Protect.* **8**, 251–264.

Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T. and Terrada, E. (1999). New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. *Nucl. Acids Res.* **27**, 1564–1565.

Olson, A.J., Bricogne, G. and Harrison, S.C. (1983). Structure of tomato bushy stunt virus: IV. The virus particle at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **171**, 61–93.

Olson, A.J., Tainer, J.A. and Getsoff, E.D. (1985). Computer graphics in the study of macromolecular interactions. In: D. Moras, J. Drenth, B. Strandberg, D. Suck and K. Wilson (eds) *Crystallography in Molecular Biology*, pp. 131–139. Plenum, New York.

Olsthoorn, R.C.L., Mertens, S., Brederode, F.T. and Bol, J.F. (1999). A conformational switch at the 3′-end of a plant virus RNA regulates viral replication. *EMBO J.* **18**, 4856–4864.

Olszewski, N., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. (1982). A transcriptionally active, covalently closed minichromosome of cauliflower mosaic virus DNA isolated from infected turnip leaves. *Cell* **29**, 395–402.

Omar, S.A.M., Bailiss, K.W., Chapman, G.P. and Mansfield, J.W. (1986). Effects of virus infection of faba bean on subsequent infection by *Uromyces viciae-fabae*. *Plant Pathol.* **35**, 535–543.

Omura, T. (1995). Genomes and primary protein structures of phytoreoviruses. *Semin. Virol.* **6**, 97–102.

Omura, T. and Yan, J. (1999). Role of outer capsid proteins in transmission of phytoreovirus in insect vectors. *Adv. Virus Res.* **54**, 15–43.

Omura, T., Minobe, Y., Matsuoka, M., Nozu, Y., Tsuchizaki, T. and Saito, Y. (1985). Location of structural proteins in particles of rice gall dwarf virus. *J. Gen. Virol.* **66**, 811–815.

Omura, T., Takahashi, Y., Shohara, K., Minobe, Y., Tsuchizaki, T. and Nozu, Y. (1986). Production of monoclonal antibodies against rice stripe virus for the detection of virus antigen in infected plants and viruliferous insects. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **52**, 270–277.

Omura, T., Kimura, I., Tsuchizaki, T. and Saito, Y. (1988). Infection by rice gall dwarf virus of cultured monolayers of leafhopper cells. *J. Gen. Virol.* **69**, 429–432.

Ooshika, I., Watanabe, Y., Meshi, T. *et al.* (1984). Identification of the 30K protein of TMV by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic peptide. *Virology* **132**, 71–78.

Oostergetel, G.T., Krijgsman, P.C.J., Mellema, J.E., Cusack, S. and Miller, A. (1981). Evidence for the absence of swelling of alfalfa mosaic virions. *Virology* **109**, 206–210.

Oostergetel, G.T., Mellema, J.E. and Cusack, S. (1983). Solution scattering study on the structure of alfalfa mosaic virus strain VRU. *J. Mol. Biol.* **171**, 157–173.

Opalka, N., Brugidou, C., Bonneau, C. *et al.* (1998). Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 3323–3328.

Opalka, N., Tihova, M., Brugidou, C. *et al.* (2000). Structure of native and expanded sobemoviruses by electron cryo-microscopy and image reconstruction. *J. Molec. Biol.* **303**, 197–211.

Oparka, K.J. and Prior, D.A.M. (1992). Direct evidence for pressure-generated closure of plasmodesmata. *Plant J.* **2**, 741–750.

Oparka, K.J., Boevink, P. and Santa Cruz, S. (1992) Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends Plant. Sci.* **1**, 412–418.

Oparka, K.J., Boevink, P. and Santa Cruz, S. (1996). Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends Plant Sci.* **1**, 412–418.

Oparka, K.J., Prior, D.A.M., Santa Cruz, S., Padgett, H.S. and Beachy, R.N. (1997). Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *Plant J.* **12**, 781–789.

Oparka, K.J., Roberts, A.G., Boevink, P. *et al.* (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the non-specific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* **97**, 743–754.

Orellana, R.G., Fan, F. and Sloger, C. (1978). Tobacco ringspot virus and *Rhizobium* interactions in soybean: Impairment of leghemoglobin accumulation and nitrogen fixation. *Phytopathology* **68**, 577–582.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T. (1989a). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-stranded conformation polymorphisms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 2766–2770.

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K. (1989b). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**, 874–879.

Orlandi, O., Gussow, D.H., Jones, P.T. and Winter, G. (1989). Cloning immunoglobulin variable domains for the expression by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 3833–3837.

Orlob, G.B. (1963). Reappraisal of transmission of tobacco mosaic virus by insects. *Phytopathology* **53**, 822–830.

Orlob, G.B. (1966). Feeding and transmission characteristics of *Aceria tulipae* Keifer as a vector of wheat streak mosaic virus. *Phytopathol. Z.* **55**, 218–238.

Orlob, G.B. (1968). Relationships between *Tetranychus urticae* Koch and some plant viruses. *Virology* **35**, 121–133.

Orlob, G.B. and Takahashi, Y. (1971). Location of plant viruses in two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Phytopathol. Z.* **72**, 21–28.

Orozco, B.M. and Hanley-Bowdoin, L. (1996). A DNA structure is required for geminivirus origin function. *J. Virol.* **270**, 148–158.

Orozco, B.M. and Hanley-Bowdoin, L. (1998). Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 24448–24456.

Orozco, B.M., Miller, A.R., Settlage, S.B. and Hanley-Bowdoin, L. (1997). Functional domains of ageminivirus replication protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 9840–9846.

Orozco, B.M., Gladfelter, H.J., Settlage, S.B., Eagle, P.A., Gentry, R. and Hanley-Bowdoin, L. (1998). Multiple *cis* elements contribute to geminivirus origin functions. *Virology* **242**, 346–356.

Orr, C.C. and Newton, O.H. (1971). Distribution of nematodes by wind. *Plant Dis. Rep.* **55**, 61–63.

Osaki, T., Yamada, M. and Inouye, T. (1985). Whitefly-transmitted viruses from three plant species (abstract in Japanese). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* **51**, 82–83.

Osborne, A.B. and Schwartz, M.I. (1994). Essential genes that regulate apoptosis. *Trends Cell Biol.* **4**, 394–403.

Osbourn, J.K., Plaskitt, K.A., Watts, J.W. and Wilson, T.M.A. (1989a). Tobacco mosaic virus coat protein and reporter gene transcripts containing the TMV origin-of-assembly sequence do not interact in double-transgenic tobacco plants: implications for coat protein-mediated protection. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2**, 340–345.

Osbourn, J.K., Watts, J.W., Beachy, R.N. and Wilson, T.M.A. (1989b). Evidence that nucleocapsid disassembly and a later step in virus replication are inhibited in transgenic tobacco protoplasts expressing the TMV coat protein. *Virology* **172**, 370–373.

Oshima, K., Taniyama, T., Yamanaka, T., Ishikawa, M and Naito, S. (1998). Isolation of a mutant of *Arabidopsis thaliana* carrying two simultaneous mutations affecting tobacco mosaic virus multiplication within a single cell. *Virology* **243**, 472–481.

Osman, F., Choi, Y.G., Grantham, G.L. and Rao, A.L.N. (1998). Molecular studies on bromovirus capsid protein: V. Evidence for the specificity of brome mosaic virus encapsidation using RNA3 chimera of brome mosaic and cucumber mosaic viruses expressing heterologous coat proteins. *Virology* **251**, 438–448.

Osman, T.A.M. and Buck, K.W. (1992). Detection of the movement protein of red clover necrotic mosaic virus in a cell wall fraction from infected *Nicotaina clevelandii* plants. *J. Gen. Virol.* **72**, 2853–2856.

Osman, T.A.M. and Buck, K.W. (1996). Complete replication *in vitro* of tobacco mosaic virus RNA by a template-dependent membrane-bound RNA polymerase. *J. Virol.* **70**, 6227–6234.

Osman, T.A.M. and Buck, K.W. (1997). The tobacco mosaic virus RNA polymerase complex contains a plant protein related to the RNA-binding subunit of yeast eIF-3. *J. Virol.* **71**, 6075–6082.

Osman, T.A.M., Hayes, R.J. and Buck, K.W. (1992). Cooperative binding of the red clover necrotic mosaic virus movement protein to single-stranded nucleic acids. *J. Gen. Virol.* **73**, 223–227.

Osman, T.A.M., Hemenway, C.L. and Buck, K.W. (2000). Role of the 3′ tRNA-like structure in tobacco mosaic virus minus-strand RNA synthesis by the viral RNA-dependent RNA polymerase *in vitro*. *J. Virol* **74**, 11671–11680.

Oster, S.K., Wu, B. and White, K.A. (1998). Uncoupled expression of p33 and p92 permits amplification of tomato bushy stunt virus RNAs. *J. Virol* **72**, 5845–5851.

Othman, R.Y. (1994). Molecular studies on southern bean mosaic virus. PhD thesis, University of East Anglia, UK.

Othman, Y. and Hull, R. (1995). Nucleotide sequence of the bean strain of southern bean mosaic virus. *Virology* **206**, 287–297.

Otsuki, Y. and Takebe, I. (1969). Fluorescent antibody staining of tobacco mosaic virus antigen in tobacco mesophyll protoplasts. *Virology* **38**, 497–499.

Otsuki, Y. and Takebe, I. (1976a). Double infection of isolated tobacco mesophyll protoplasts by unrelated plant viruses. *J. Gen. Virol.* **30**, 309–316.

Otsuki, Y. and Takebe, I. (1976b). Interaction of tobacco mosaic virus strains in doubly infected tobacco protoplasts. *Ann. Microbiol. (Paris)* **127**, 21 (abstract).

Otsuki, Y. and Takebe, I. (1978). Production of mixedly coated particles in tobacco mesophyll protoplasts doubly infected by strains of tobacco mosaic virus. *Virology* **84**, 162–171.

Otsuki, Y., Takebe, I., Honda, Y. and Matsui, C. (1972a). Ultrastructure of infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. *Virology* **49**, 188–194.

Otsuki, Y., Shimomura, T. and Takebe, I. (1972b). Tobacco mosaic virus multiplication and expression of the N gene in necrotic responding tobacco varieties. *Virology* **50**, 45–50.

Otsuki, Y., Takebe, I., Ohno, T., Fukuda, M. and Okada, Y. (1977). Reconstitution of tobacco mosaic virus rods occurs bidirectionally from an internal initiation region: demonstration by electron microscopic serology. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 1913–1917.

Ou, J.H., Rice, C.M., Dalgarno, L., Strauss, E.G. and Strauss, J.H. (1982). Sequence studies of several alphavirus genomic RNAs in the region containing the start of the subgenomic RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 5235–5239.

Ouchterlony, O. (1962). Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. *Prog. Allergy* **6**, 30–154.

Overall, R.L. and Blackman, L.M. (1996). A model if the macromolecular structure of plasmodesmata. *Trends Plant Sci.* **1**, 307–311.

Owen, J. and Palukaitis, P. (1988). Characterisation of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA3 in eight CMV strains. *Virology* **166**, 495–502.

Owens R.A. (1999). Viroids. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, pp. 1928–1937. Academic Press, San Diego.

Owens, R.A. and Bruening, G. (1975). The pattern of amino acid incorporation into two cowpea mosaic virus proteins in the presence of ribosome-specific protein synthesis inhibitors. *Virology* **64**, 520–530.

Owens, R.A. and Cress, D.E. (1980). Molecular cloning and characterisation of potato spindle tuber viroid cDNA sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **77**, 5302–5306.

Owens, R.A. and Diener, T.O. (1981). Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science* **213**, 670–672.

Owens, R.A. and Diener, T.O. (1982). RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 113–117.

Owens, R.A. and Diener, T.O. (1984). Spot hybridization for detection of viroids and viruses. *Methods Virol.* **7**, 173–187.

Owens, R.A. and Kaper, J.M. (1977). Cucumber mosaic virus-associated RNA5. II. *In vitro* translation in a wheat germ protein-synthesis system. *Virology* **80**, 196–203.

Owens, R.A. and Schneider, I.R. (1977). Satellite of tobacco ringspot virus RNA lacks detectable mRNA activity. *Virology* **80**, 222–224.

Owens, R.A., Hammond, R.W., Gardner, R.C., Kiefer, M.C., Thompson S.M. and Cress, D.E (1986). Site-specific mutagenesis of potato spindle tuber viroid cDNA: alterations within premelting region 2 that abolish infectivity. *Plant Mol. Biol.* **6**, 179–192.

Owens, R.A., Candresse, T. and Diener, T.O. (1990). Construction of novel viroid chimeras containing portions of tomato apical stunt and citrus exocortis viroids. *Virology* **175**, 238–246.

Owens, R.A., Thompson, S.M., Feldstein, P.A. and Garnsey, S.M. (1999). Effects of natural sequence variation on symptom induction by citrus viroid III. *Ann. Appl. Biol.* **134**, 73–80.

Owusu, G.K., Crowley, N.C. and Francki, R.I.B. (1968). Studies of the seed-transmission of tobacco ringspot virus. *Ann. Appl. Biol.* **61**, 195–202.

Oxelfelt, P. (1970). Development of systemic tobacco mosaic virus infection: I. Initiation of infection and time course of virus multiplication. *Phytopathol. Z.* **69**, 202–211.

Oxelfelt, P. (1976) Biological and physicochemical characteristics of three strains of red clover mottle virus. *Virology* **74**, 73–80.

Pacha, R.F., Allison, R.F. and Ahlquist, P. (1990). Cis-acting sequences required for *in vivo* amplification of genomic RNA3 are organised differently in related bromoviruses. *Virology* **174**, 436–443.

Pacumbaba, R.P. (1995). Seed transmission of soybean mosaic virus in mottled and nonmottled soybean seeds. *Plant Dis.* **79**, 193–195.

Padgett, H.S. and Beachy, R.N. (1993). Analysis of a tobacco mosaic virus strain capable of overcoming *N* gene-mediated resistance. *Plant Cell* **5**, 577–586.

Padgett, H.S., Epel, B.L., Kahn, T.W., Heinlein, M., Watanabe, Y. and Beachy, R.N. (1996). Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *Plant J.* **10**, 1079–1088.

Padgett, H.S., Watanabe, Y. and Beachy, R.N. (1997). Identification of the TMV replicase sequence that activates the *N*-gene mediated hypersensitive response. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 709–715.

Padidam, M., Sawyer, S. and Fauquet, C.M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265**, 218–225.

Paduch-Cichal, E. and Kryczynski, S. (1987). A low-temperature therapy and meristem-tip culture for eliminating four viroids from infected plants. *J. Phytopathol.* **118**, 341–346.

Paguio, O.R., Kuhn, C.W. and Boerma, H.R. (1988). Resistance-breaking variants of cowpea chlorotic mottle virus in soybean. *Plant Dis.* **72**, 768–770.

Pal, N., Moon, J.S., Sandhu, J., Domier, L.L. and D'Arcy, C.J. (2000). Production of barley yellow dwarf virus antisera by DNA immunization. *Can. J. Plant Pathol.* **22**, 410–415.

Palacio-Bielsa, A., Foissac, X. and Duran-Vila, N. (1999). Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**, 897–903.

Palanichelvam, K. and Schoelz, J.E. (2001). Uncoupling sequences within CaMV gene VI required for translational transactivation from those that elicit a hypersensitive defense response. Abstract W21-5, 20th Annual Meeting of the American Society for Virology.

Palanichelvam, K., Cole, A.B., Shababi, M. and Schoelz, J.E. (2000). Agroinfiltration of cauliflower mosaic virus gene VI elicits hypersensitive response in *Nicotiana* species. *Mol. Plant Microb. Interact.* **13**, 1275–1279.

Palauqui, J.-C., Elmayan, T., Pollien, J.-M. and Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* **16**, 4738–4745.

Paliwal, Y.C. (1980). Relationship of wheat streak mosaic and barley stripe mosaic viruses to vector and nonvector eriophyid mites. *Arch. Virol.* **63**, 123–132.

Pallas, V., Sanchez-Navarro, J.A. and Diez, J. (1999). *In vitro* evidence for RNA binding properties of the coat protein of prunus necrotic ringspot Ilarvirus and their comparison to related and unrelated viruses. *Archiv. Virol.* **144**, 797–803.

Palmenberg, A. (1990). Proteolytic processing of picornaviral polyproteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 603–623.

Palmer, K.E. and Rybicki, E.P. (1997). The use of geminiviruses in biotechnology and plant molecular biology, with particular focus on Mastreviruses. *Plant Sci.* **129**, 115–130.

Palmer, K.E. and Rybicki, E.P. (1998). The molecular biology of mastreviruses. *Adv. Virus Res.* **50**, 183–234.

Palomar, M.K. and Brakke, M.K. (1976). Concentration and infectivity of barley stripe mosaic virus in barley. *Phytopathology* **66**, 1422–1426.

Paludan, N. (1985). Spread of viruses by a recirculating water supply in soilless culture. *Phytoparasitica* **13**, 276.

Palukaitis, P. (1984). Detection and characterisation of subgenomic RNA in plant viruses. *Methods Virol.* **7**, 259–317.

Palukaitis, P. (1987). Potato spindle tuber viroid: investigation of the long-distance, intra-plant transport route. *Virology* **158**, 239–241.

Palukaitis, P. (1988). Pathogenicity regulation by satellite RNAs of cucumber mosaic virus: minor nucleotide sequence changes alter host responses. *Mol. Plant Microbe Interact.* **1**, 175–181.

Palukaitis, P. and Roossinck, M.J. (1996). Spontaneous change of a benign satellite RNA of cucumber mosaic virus to a pathogenic variant. *Nature Biotech.* **14**, 1264–1268.

Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1984). Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: characterization of two new satellites. *Virology* **132**, 426–435.

Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1987). The nature and biological significance of linear potato spindle tuber viroid molecules. *Virology* **157**, 199–210.

Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1997). Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Adv. Virus Res.* **48**, 349–377.

Palukaitis, P., Rakowski, A.G., Alexander, D.McE. and Symons, R.H. (1981). Rapid indexing of the sunblotch disease of avocados using a complementary DNA probe to avocado sunblotch viroid. *Ann. Appl. Biol.* **98**, 439–449.

Palukaitis, P., García-Arenal, F., Sulzinski, M.A. and Zaitlin, M. (1983). Replication of tobacco mosaic virus: VII. Further characterization of single- and double-stranded virus-related RNAs from TMV-infected plants. *Virology* **131**, 533–545.

Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G. and Francki, R.I.B. (1992). Cucumber mosaic virus. *Adv. Virus Res.* **41**, 281–348.

Pang, S.-Z., Slightom, J.L. and Gonsalves, D. (1993). Different mechanisms protect transgenic tobacco against tomato spotted wilt and impatiens necrotic spot tospoviruses. *Biotechnology* **11**, 819–824.

Panté, N. and Aebi, U. (1994). Towards understanding the three dimensional structure of the nuclear pore complex at the molecular level. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 187–196.

Pappu, H.R., Karasev, A.V., Anderson, E.J. *et al.* (1994). Nucleotide sequence and organization of eight 3′ open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* **199**, 35–46.

Pappu, S.S., Brand, R., Pappu, H.R. *et al.* (1993). A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3′ sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. *J. Virol. Methods* **41**, 9–20.

Parejarlarn, A., Lapis, D.B. and Hibino, H. (1984). Reaction of rice varieties to rice ragged stunt virus (RSV) infection by three known plant hopper (BPH) biotypes. *Int. Rice Res. Newsl.* **9**, 7–8.

Pares, R.D. (1988). Serological comparison of an Australian isolate of capsicum mosaic virus with capsicum tobamovirus isolates from Europe and America. *Ann. Appl. Biol.* **112**, 609–612.

Pares, R.D., Gunn, L.V. and Keskula, E.N. (1996). The role of infective plant debris, and its concentration in soil, in the ecology of tomato mosaic tobamovirus—a non-vectored plant virus. *J. Phytopathol.* **144**, 147–150.

Paris, H.S. and Cohen, S. (2000). Oligogenic inheritance for resistance to *Zucchini yellow mosaic virus* in *Cucurbita pepo*. *Ann. Appl. Biol.* **136**, 209–214.

Paris, H.S., Cohen, S., Burger, Y. and Yoseph, R. (1988). Single-gene resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita moschata*. *Euphytica* **37**, 27–29.

Parish, R.W. (1975). The lysosome concept in plants. I. Peroxidases associated subcellular and wall functions of maize root tips: implications for vacuole development. *Planta* **123**, 1–13.

Parker, J.E., Feys, B.J., van der Biezen, E.A. *et al.* (2000). Unravelling R gene-mediated disease resistance pathways in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Pathol.* **1**, 17–24.

Parkinson, J. (1656). 'Paradisi in sole paradisus teffestris, or a garden of all sorts of pleasant flowers . . . with a kitchen garden of all manner of herbes etc.' London.

Parks, T.D., Howard, E.D., Wolpert, T.J., Arp, D.J. and Dougherty, W.G. (1995). Expression and purification of a recombinant tobacco etch virus NIa proteinase: biochemical analyses of the full-length and a naturally occurring truncated proteinase form. *Virology* **210**, 194–201.

Partridge, J.E., Shannon, L. and Gumpf, D. (1976). A barley lectin that binds free amino sugars: I. Purification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **451**, 470–483.

Pascal, E., Sanderfoot, A.A., Ward, B.W., Medville, R., Turgeon, R. and Lazarowitz, S.G. (1994). The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell* **6**, 995–1006.

Paszkowski, J., Pisan, B., Shillito, R.D., Hohn, T., Hohn, B. and Potrykus, I. (1986). Genetic transformation of *Brassica compestris* var. *rapa* protoplasts with an engineered cauliflower mosaic virus genome. *Plant Mol. Biol.* **6**, 303–312.

Patterson, S. and Verduin, B.J.M. (1987). Applications of immunogold labelling in animal and plant virology. *Arch. Virol.* **97**, 1–26.

Pavord, A. (1999). *The Tulip*. Bloomsbury, London.

Pawley, G.S. (1962). Plane groups on polyhedra. *Acta Crystallogr.* **15**, 49–53.

Pead, M.T. and Torrance, L. (1989). Some characteristics of monoclonal antibodies to a British MAV-like isolate of barley yellow dwarf virus. *Ann. Appl. Biol.* **113**, 639–644.

Peden, K.W.C., May, J.T. and Symons, R.H. (1972). A comparison of two plant virus-induced RNA polymerases. *Virology* **47**, 498–501.

Pelchat, M., Deschênes, P. and Perreault, J.-P. (2000). The database of the smallest known auto-replicable RNA species: viroids and viroid-like RNAs. *Nucl. Acids Res.* **28**, 179–180.

Pelcher, L.E., Murakishi, H.H. and Hartmann, J.X. (1972). Kinetics of TMV-RNA synthesis and its correlation with virus accumulation and crystalline viral inclusion formation in tobacco tissue culture. *Virology* **47**, 787–796.

Pelham, H.R.B. (1978). Leaky UAG termination codon in tobacco mosaic virus RNA. *Nature (London)* **272**, 469–471.

Pelham, H.R.B. (1979). Translation of tobacco rattle virus RNAs *in vitro*: four proteins from three RNAs. *Virology* **97**, 256–265.

Pennazio, S. and Roggero, P. (1988). Systemic acquired resistance induced in tobacco plants by localized virus infection does not operate against challenging viruses that infect systemically. *J. Phyopathol.* **121**, 255–266.

Pennazio, S. and Roggero, P. (1996). Plant hormones and plant virus diseases: the auxins. *Microbiologica* **19**, 369–378.

Pennazio, S. and Roggero, P. (1998). Endogenous changes in cytokinin activity in systemically virus-infected plants. *Microbiologica* **21**, 419–426.

Pennazio, S. and Sapetti, C. (1981). Electrolyte leakage in relation to viral and abiotic stresses inducing necrosis in cowpea leaves. *Biol. Plant.* **24**, 218–255.

Pennazio, S., Roggero, P. and Gentile, I.A. (1985). Effects of salicylate on virus-infected tobacco plants. *Phytopathol. Z.* **114**, 203–213.

Pennazio, S., Roggero, P. and Conti, M. (1999). Plasmodesmata and plant viruses: a centenary story. *Microbiologica* **22**, 389–404.

Pennington, R.E. and Melcher, U. (1993). *In planta* deletion of DNA inserts from the large intergenic region of cauliflower mosaic virus DNA. *Virology* **192**, 188–196.

Pereira, L.G., Torrance, L., Roberts, I.M. and Harrison, B.D. (1994). Antigenic structure of the coat protein of potato mop-top furovirus. *Virology* **203**, 277–285.

Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y. and Dolja, V.V. (1999). HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 14771–14776.

Pérez de san Román, C., Legorburu, F.J., Pascualena, J. and Gil, A. (1988). Simultaneous detection of potato viruses Y, leaf roll, X and S by DAS-ELISA technique with artificial polyvalent antibodies (APAs). *Potato Res.* **31**, 151–158.

Perham, R.N. (1973). The reactivity of functional groups as a probe for investigating the topography of tobacco mosaic virus: the use of mutants with additional lysine residues in the coat protein. *Biochem. J.* **131**, 119–126.

Perham, R.N. and Wilson, T.M.A. (1976). The polarity of stripping of coat protein subunits from the RNA in tobacco mosaic virus under alkaline conditions. *FEBS Lett.* **62**, 11–15.

Perham, R.N. and Wilson, T.M.A. (1978). The characterization of intermediates formed during the disassembly of tobacco mosaic virus at alkaline pH. *Virology* **84**, 293–302.

Perlak, F.J., Kaniewski, W.K., Lawson, E.C., Vincent, M.N. and Feldman, J. (1995). Genetically improved potatoes: their potential role in integrated pest management. In: M. Manka (ed.) *Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control*, pp. 451–454. Polish Phytopathological Society, Poznan, Poland.

Perler, F.B. (1999). A natural example of protein trans-splicing. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 209–211.

Perret, V., Florentz, C., Dreher, T. and Giege, R. (1989). Structural analogies between the 3′ tRNA-like structure of brome mosaic virus RNA and yeast $tRNA^{tyr}$, revealed by protection studies with yeast tyrosyl-tRNA synthetase. *Eur. J. Biochem.* **185**, 331–339.

Perrin, R.M. and Gibson, R.W. (1985). Control of some insect-borne plant viruses with the pyrethroid PP321 (Karate). *Int. Pest Control* **Nov/Dec**, 142–143.

Perring, T.M., Gruenhagen, N.M. and Farrar, C.A. (1999). Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. *Annu. Rev. Entomol.* **44**, 457–481.

Perry, J.N. (1998). Measures of spatial pattern for counts. *Ecology* **79**, 1008–1017.

Perry, K.L., Zhang, L., Shintaku, M.H. and Palukaitis, P. (1994). Mapping determinants in cucumber mosaic virus for transmission by *Aphis gossypii*. *Virology* **205**, 591–595.

Perry, K.L., Zhang, L. and Palukaitis, P. (1998). Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology* **242**, 204–210.

Perry, K.L., Ng, J., Liu, S. and Smith, T.J. (2001). Structural determinants in the vector transmission of cucumber mosaic virus. Abstract W33–5, 20[th] Annual Meeting of the American Society for Virology.

Pesic, Z., Hiruki, C. and Chen, M.H. (1988). Detection of viral antigen by immunogold cytochemistry in ovules, pollen and anthers of alfalfa infected with alfalfa mosaic virus. *Phytopathology* **78**, 1027–1032.

Peters, D. and Black, L.M. (1970). Infection of primary cultures of aphid cells with a plant virus. *Virology* **40**, 847–853.

Peters, S.A., Voorhorst, W.G.B., Wery, J., Wellink, J. and van Kammen, A. (1992). A regulatory role for the 32K protein in proteolytic processing of cowpea mosaic virus polyproteins. *Virology* **191**, 81–89.

Peterson, J.F. and Brakke, M.K. (1973). Genomic masking in mixed infections with brome mosaic and barley stripe mosaic viruses. *Virology* **51**, 174–182.

Petty, I.T.D., Hunter, B.G., Wei, N. and Jackson, A.O. (1989). Infectious barley stripe mosaic virus RNA transcribed *in vitro* from full-length genomic cDNA clones. *Virology* **171**, 342–349.

Petty, I.T.D., French, R., Jones, R.W. and Jackson, A.O. (1990). Identification of barley stripe mosaic virus genes involved in viral replication and systemic movement. *EMBO J.* **9**, 3453–3457.

Pfeiffer, P. (1998). Nucleotide sequence, genetic organization and expression strategy of the double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility trait in *Vicia faba*. *J. Gen. Virol.* **79**, 2349–2358.

Pfeiffer, P. and Durham, A.C.H. (1977). The cation binding associated with structural transitions in bromegrass mosaic virus. *Virology* **81**, 419–432.

Pfeiffer, P. and Hohn, T. (1983). Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus: a detailed model and test of some aspects. *Cell* **33**, 781–789.

Pfeiffer, P. and Hohn, T. (1989). Cauliflower mosaic virus as a probe for studying gene expression in plants. *Physiol. Plant.* **77**, 625–632.

Pfeiffer, P., Laquel, P. and Hohn, T. (1984). Cauliflower mosaic virus replication complexes: characterisation of the associated enzymes and the polarity of DNA synthesised *in vitro*. *Plant Mol. Biol.* **3**, 261–270.

Pfeiffer, P., Gordon, K., Filtterer, J. and Hohn, T. (1987). The life cycle of cauliflower mosaic virus. In: D. von Wettstein and N.-H. Chua (eds) *Plant Molecular Biology*, pp. 443–458. Plenum, New York.

Pfister, T., Mirzayan, C. and Wimmer, E. (1999). Polioviruses (*Picornaviridae*): molecular biology. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1330–1348. Academic Press, San Diego.

Piazzolla, P., Tousignant, M.E. and Kaper, J.M. (1982). Cucumber mosaic virus-associated RNA5. IX. The overtaking of viral RNA synthesis by CARNA5 and dsCARNA5 in tobacco. *Virology* **122**, 147–157.

Piazzolla, P., Rubino, L., Tousignant, M.E. and Kaper, J.M. (1989a). Two different types of satellite RNA associated with chicory yellow mottle virus. *J. Gen. Virol.* **70**, 949–954.

Piazzolla, P., Palmieri, F. and Nuzzaci, M. (1989b). Infectivity studies on cucumber mosaic virus treated with a clay material. *J. Phytopathol.* **127**, 291–295.

Pierpoint, W.S. (1966). The enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. *Biochem. J.* **98**, 567–580.

Pierpoint, W.S., Ireland, R.J. and Carpenter, J.M. (1977). Modification of proteins during the oxidation of leaf phenols: reaction of potato virus X with chlorogenoquinone. *Phytochemistry* **16**, 29–34.

Pietrzak, M. and Hohn, T. (1987). Translation products of cauliflower mosaic virus ORF V, the coding region corresponding to the retrovirus pol gene. *Virus Genes* **1**, 83–96.

Pilowski, M., Frankel, R. and Cohen, S. (1981). Studies of the variable reaction at high temperature of F1 hybrid tomato plants resistant to tobacco mosaic virus. *Phytopathology* **71**, 319–323.

Pinck, L. and Hirth, L. (1972). The replicative RNA and the viral RNA synthesis rate in tobacco infected with alfalfa mosaic virus. *Virology* **49**, 413–425.

Pinck, L., Genevaux, M., Bouley, J.P. and Pinck, M. (1975). Amino acid accepter activity of replicative form from some tymovirus RNAs. *Virology* **63**, 589–590.

Pinck, M., Yot, P., Chapeville, F. and Duranton, H.M. (1970). Enzymatic binding of valine to the 3′ end of TYMV-RNA. *Nature (London)* **226**, 954–956.

Piron, P.G.M. (1986). New aphid vectors of potato virus YN. *Neth. J. Plant Pathol.* **92**, 223–229.

Pirone, T.P. (1967). Acquisition and release of infectious tobacco mosaic virus by aphids. *Virology* **31**, 569–571.

Pirone, T.P. (1977). Accessory factors in nonpersistent virus transmission. In: K.F. Harris and K. Maramorosch (eds) *Aphids as Virus Vectors*, pp. 221–235. Academic Press, New York.

Pirone, T.P. and Blanc, S. (1996). Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu Rev. Phytopathol.* **34**, 227–247.

Pirone, T.P. and Thornbury, D.W. (1988). Quantity of virus required for aphid transmission of a potyvirus. *Phytopathology* **7**, 104–107.

Pirone, T.P., Raccah, B. and Madden, L.V. (1988). Suppression of aphid colonization by insecticides: effect on the incidence of potyviruses in tobacco. *Plant Dis.* **72**, 350–353.

Pita, J.S., Fondong, V.N., Sangaré, A., Otim-Nape, G.W., Ogwal, S. and Fauquet, C.M. (2001). Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *J. Gen. Virol.* **82**, 655–665.

Plant, A.L., Covey, S.N. and Grierson, D. (1985). Detection of a subgenomic mRNA for gene V, the putative reverse transcriptase gene of cauliflower mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* **13**, 8305–8321.

Plaskitt, K.A., Watkins, P.A.C., Sleat, D.E., Gallie, D.R., Shaw, J.G. and Wilson, T.M.A. (1987). Immunogold labelling locates the site of disassembly and transient gene expression of tobacco mosaic virus-like pseudovirus particles *in vivo*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **1**, 10–16.

Pleij, C.W.A., Mellema, J.R., Noort, A. and Bosch, L. (1977). The occurrence of the coat protein messenger RNA in the minor components of turnip yellow mosaic virus. *FEBS Lett.* **80**, 19–22.

Pleše, N., Hoxha, E. and Miličić, D. (1975). Pathological anatomy of trees affected with apple stem grooving virus. *Phytopathol. Z.* **82**, 315–325.

Plochocka, D., Welnicki, M., Zielenkiewicz, P. and Ostoja-Zagórski, W. (1996). Three-dimensional model of the potyviral genome-linked protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 12150–12154.

Ploeg, A.T., Brown, D.J.F. and Robinson, D.J. (1992). The association between species of *Trichodorus* and *Paratrichodorus* vector nematodes and serotypes of tobacco rattle tobravirus. *Ann. Appl. Biol.* **121**, 619–630.

Ploeg, A.T., Mathis, A., Bol, J.F., Brown, D.J.F and Robinson, D.J. (1993a). Susceptibility of transgenic tobacco plants expressing tobacco rattle virus coat protein to nematode-transmitted and mechanically inoculated tobacco rattle virus. *J. Gen. Virol.* **74**, 2709–2715.

Ploeg, A.T., Robinson, D.J. and Brown, D.J.F. (1993b). RNA-2 of tobacco rattle virus encodes the determinants of transmissibility by trichodorid vector nematodes. *J. Gen. Virol.* **74**, 1463–1466.

Ploubidou, A. and Way, M. (2001). Viral transport and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 97–105

Pobjecky, N., Rosenberg, G.H., Dinter-Gottlieb, G. and Kaufer, N.F. (1990). Expression of the β-glucoronidase gene under the control of the CaMV 35S promoter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* **220**, 314–316.

Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. and Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* **8**, 3867–3874.

Podleckis, E.V., Hammond, R.W., Hurtt, S.S. and Hadidi, A. (1993). Chemilumiscent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigenin-labeled dot-blot and tissue-blot hybridization. *J. Virol. Methods* **43**, 147–158.

Pogany, J. and Bujarski, J.J. (1996). Complementary sequences facilitate deletions in defective (D) RNAs associated with broad bean mottle bromovirus (BBMV). Presented at the 15th Annual Meeting of the American Society for Virology, University of Western Ontario, Canada.

Pogany, J., Romero, J., Huang, Q., Sgro, J.-Y., Shang, H. and Bujarski, J.J. (1995). *De novo* generation of defective interfering-like RNAs in broad bean mottle bromovirus. *Virology* **212**, 574–586.

Polak, J. (1983). Variability of resistance of white cabbage to turnip mosaic virus. *Tagungsber. Akad. Landwirtschaftswiss. D.D.R.* **216**, 331–335.

Pollard, D.G. (1977). Aphid penetration of plant tissues. In: K.F. Harris and K. Maramorosch (eds) *Aphids as Virus Vectors*, pp. 105–118. Academic Press, New York.

Polson, A. and von Wechmar, M.B. (1980). A novel way to transmit plant viruses. *J. Gen. Virol.* **51**, 179–181.

Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., von Maltzahn, E. and van der Merwe, K.J. (1985). Improvements in the isolation of IgY from yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol. Invest.* **14**: 323–327.

Ponsen, M.B. (1977). Anatomy of an aphid vector: *Myzus persicae*. In: K.F. Harris and K. Maramorosch (eds) *Aphids as Virus Vectors*, pp. 63–82. Academic Press, New York.

Pontier, D., Gan, S., Amasino, R.M., Roby, D. and Lam, E. (1999). Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Mol. Biol.* **39**, 1243–1255.

Ponz, F. and Bruening, G. (1986). Mechanisms of resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**, 355–381.

Ponz, F., Glascock, C.B. and Bruening, G. (1988a). An inhibitor of polyprotein processing with the characteristics of a natural virus resistance factor. *Mol. Plant Microbe Interact.* **1**, 25–31.

Ponz, F., Russell, M.L., Rowhani, A. and Bruening, G. (1988b). A cowpea line has distinct genes for resistance to tobacco ringspot virus and cowpea mosaic virus. *Phytopathology* **78**, 1124–1128.

Pooggin, M.M. and Skryabin, K.G. (1992). The 5′-untranslated leader sequence of potato virus X RNA enhances the expression of a heterologous gene *in vivo*. *Mol. Gen. Genet.* **234**, 329–331.

Pooggin, M.M., Hohn, T. and Fütterer, J. (1998). Forced evolution reveals the importance of short open reading frame A and secondary structure in the cauliflower mosaic virus 35S RNA leader. *J. Virol.* **72**, 4157–4169.

Pooggin, M.M., Fütterer, J., Skryabin, K.G. and Hohn, T. (1999). A short open reading frame terminating in front of a stable hairpin is the conserved feature in pregenomic RNA leaders of plant pararetroviruses. *J. Gen. Virol.* **80**, 2217–2228.

Poolpol, P. and Inouye, T. (1986). Ultrastructure of plant cells doubly infected with potyviruses and other unrelated viruses. *Bull. Univ. Osaka Prefect. Ser. B* **38**, 13–23.

Porta, C. and Lomonossoff, G.P. (1996). Use of viral replicons for the expression of genes in plants. *Molec. Biotech.* **5**, 209–221.

Porta, C. and Lomonossoff, G.P. (1998). Scope for using plant viruses to present epitopes from animal pathogens. *Rev. Mol. Virol.* **8**, 25–41.

Porta, C., Spall, V.E., Loveland, J., Johnson, J.E., Barker, P.J. and Lomonossoff, G.P. (1994). Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology* **202**, 949–955.

Posnette, A.F. (1947). Virus diseases of cacao in West Africa: I. Cacao viruses 1A, 1B, 1C, and 1D. *Ann. Appl. Biol.* **34**, 388–402.

Posnette, A.F. (1950). Virus diseases of cacao in West Africa. VII. Virus transmission by different vector species. *Ann. Appl. Biol.* **37**, 378–384.

Posnette, A.F. (1969). Tolerance of virus infection in crop plants. *Rev. Appl. Mycol.* **48**, 113–118.

Posnette, A.F. and Robertson, N.F. (1950). Virus diseases of cacao in West Africa. VI. Vector investigations. *Ann. Appl. Biol.* **37**, 363–377.

Posnette, A.F. and Todd, J.M.C.A. (1955). Virus diseases of cacao in West Africa. IX. Strain variation and interference in virus 1A. *Ann. Appl. Biol.* **43**, 433–453.

Powell-Abel, P., Nelson, R.S., De, B. *et al.* (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco virus coat protein gene. *Science* **232**, 738–743.

Powell, C.A. (1975). The effect of cations on the alkaline dissociation of tobacco mosaic virus. *Virology* **64**, 75–85.

Powell, C.A. and de Zoeten, G.A. (1977). Replication of pea enation mosaic virus RNA in isolated pea nuclei. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 2919–2922.

Powell, C.A., de Zoeten, G.A. and Gaard, G. (1977). The localization of pea enation mosaic virus-induced RNA-dependent RNA polymerase in infected peas. *Virology* **78**, 135–143.

Powell, C.A., Pelosi, R.R. and Cohen, M. (1992). Superinfection of orange trees containing mild isolates of citrus tristeza virus with severe Florida isolates of citrus tristeza virus. *Plant Dis.* **76**, 141–144.

Powell, C.A., Pelosi, R.R., Rundell, P.A., Stover, E. and Cohen, M. (1999). Cross-protection of grapefruit from decline-inducing isolates of citrus tristeza virus. *Plant Dis.* **83**, 989–991.

Powell, P.A., Stark, D.M., Sanders, P.R. and Beachy, R.N. (1989). Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 6949–6952.

Powell, P.A., Saunders, P.R., Turner, N., Frayley, R.T. and Beachy R.N. (1990). Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology* **175**, 124–130.

Power, A.G. (1996). Competition between viruses in a complex plant–pathogen. *Ecology* **77**, 1004–1010.

Pratt, M.J. and Matthews, R.E.F. (1971). Non-uniformities in the metabolism of excised leaves and leaf discs. *Planta* **99**, 21–36.

Pratt, W.B., Krishna, P and Olsen, L.J. (2001). Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers. *Trends Plant Sci.* **6**, 54–58.

Preece, D.A. (1967). Nested balanced incomplete block designs. *Biometrika* **54**, 479–486.

Preil, W., Koenig, R., Engelhardt, M. and Meier-Dinkel, A. (1982). Elimination of poinsettia mosaic virus (PoiMV) I and poinsettia cryptic virus (PoiCV) from *Euphorbia pulcherrima* Willd by cell suspension culture. *Phytopathol. Z.* **105**, 193–197.

Price, W.C. (1966). Flexuous rods in phloem cells of lime plants infected with citrus tristeza virus. *Virology* **29**, 285–294.

Pringle, C.R. (1998). The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), including new proposals ratified since publication of the sixth report in 1995. *Arch. Virol.* **143**, 203–210.

Pringle, C.R. (1999a). Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Archiv. Virol.* **144**, 2065–2070.

Pringle, C.R. (1999b). Editorial: Virus nomenclature. *Arch. Virol.* **144**, 1464–1466.

Prins, M. and Goldbach, R. (1996). RNA-mediated virus resistance in transgenic plants. *Arch. Virol.* **141**, 2259–2276.

Prins, M. and Goldbach, R. (1998). The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends Microbiol.* **6**, 31–35.

Proctor, V.W. (1968). Long-distance dispersal of seeds by retention in digestive tracts of birds. *Science* **160**, 321–322.

Prod'homme, D., Le Panse, S., Drugeon, G. and Jupin, I. (2001). Detection and subcellular localization of the turnip yellow mosaic virus 66K replication protein in infected cells. *Virology* **281**, 88–101.

Prody, G.A., Bakes, J.T., Buzayan, J.M., Schneider, I.R. and Bruening, G. (1986). Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* **231**, 1577–1580.

Proeseler, G. (1980). Piesmids. In: K.F. Harris and K. Maramorosch (eds) *Vectors of Plant Pathogens*, pp. 97–113. Academic Press, New York.

Proeseler, G. and Kastirr, U. (1988). Research into the effect of fungicides against *Polymyxa graminis* Led. as vector of barley yellow mosaic virus. *Nachrichten bl. Pflanzenschutzdienst DDR* **42**, 116–117.

Provvidenti, R. (1990). Inheritance of resistance to pea mosaic virus in *Pisum sativum*. *J. Hered.* **81**, 143–145

Provvidenti, R. and Alconero, R. (1988a). Inheritance of resistance to a lentil strain of pea seed-borne mosaic virus in *Pisum sativum*. *J. Hered.* **79**, 45–47.

Provvidenti, R. and Alconero, R. (1988b). Inheritance of resistance to a third pathotype of pea seed-borne mosaic virus in *Pisum sativum*. *J. Hered.* **79**, 76–77.

Provvidenti, R. and Schroeder, W.T. (1973). Resistance in *Phaseolus vulgaris* to the severe strain of bean yellow mosaic virus. *Phytopathology* **63**, 196–197.

Prüfer, D., Tacke, E., Schnitz, J., Kull, B., Kaufmann, A. and Rohde, W. (1992). Ribosomal frameshifting in plants: a novel signal directs the –1 frameshift in the synthesis of the putative replicase of potato leafroll luteovirus. *EMBO J.* **11**, 1111–1117.

Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. and Vance, V.B. (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**, 859–868.

Pryor, T. and Ellis, J. (1993). The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. *Adv. Plant Pathol.* **10**, 281–305.

Puchta, H., Ramm, K. and Sänger, H.L. (1988). The molecular structure of hop latent viroid (HLV) a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucl. Acids Res.* **16**, 4197–4216.

Purcifull, D.E., Hiebert, E. and McDonald, J.G. (1973). Immunochemical specificity of cytoplasmic inclusions induced by viruses in the potato Y group. *Virology* **55**, 275–279.

Putz, C., Kuszala, J., Kuszala, M. and Spindler, C. (1974). Variation de pouvoir pathogène des isolats du virus de la mosaïque du concombre associée à la necrose de la tomate. *Ann. Phytopathol.* **6**, 139–154.

Pyne, J.W. and Hall, T C. (1979). Efficient ribosome binding of brome mosaic virus (BMV) RNA4 contributes to its ability to outcompete the other BMV RNAs for translation. *Intervirology* **11**, 23–29.

Qiu, S.G., Wintermantel, W.M., Sha, Y. and Schoelz, J.E. (1997). Light-dependent systemic infection of solanaceous species by cauliflower mosaic virus can be conditioned by a viral gene encoding an aphid transmission factor. *Virology* **227**, 180–188.

Qiu, W. and Moyer, J.W. (1999). Tomato spotted wilt tospovirus adapts to the TSWV *N* gene-derived resistance by genomic reassortment. *Phytopathology* **89**, 575–582.

Qiu, Y.-L., Lee, J., Bernasconi-Quadroni, F. *et al.* (1999). The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* **402**, 404–407.

Qu, F. and Morris, T.J. (1997). Encapsidation of turnip crinkle virus is defined by a specific packaging signal and RNA size. *J. Virol.* **71**, 1428–1435.

Qu, F. and Morris, T.J. (1999). Carmoviruses (*Tombusviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 243–247. Academic Press, San Diego.

Qu, F. and Morris, T.J. (2000). Cap-independent translation enhancement of turnip crinkle virus genomic and subgenomic RNAs. *J. Virol.* **74**, 1085–1093.

Quader, H. (1990). Formation and disintegration of cisternae of the endoplasmic reticulum visualized in live cells by conventional fluorescence and confocal laser scanning microscopy: role of calcium and the cytoskeleton. *Protoplasma* **151**, 167–170.

Quadt, R., Verbeek, H.J.M. and Jaspars, E.M.J. (1988). Involvement of a non-structural protein in the RNA-synthesis of brome mosaic virus. *Virology* **165**, 256–261.

Quadt, R., Rosdorff, H.J.M., Hunt, T.W. and Jaspars, E.M.J. (1991). Analysis of the protein composition of alfalfa mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **182**, 309–315.

Quadt, R., Kao, C.C., Browning, K.S., Hershberger, R.P. and Ahlquist, P. (1993). Characterization of a host protein associated with brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 1498–1502.

Quadt, R., Ishikawa, M., Janda, M. and Ahlquist, P. (1995). Formation of brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase in yeast requires coexpression of viral proteins and viral RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 4892–4896.

Querci, M., Baulcombe, D.C., Goldbach, R.W. and Salazar, L.F. (1995). Analysis of the resistance-breaking determinants of potato virus X (PVX) strain HB on different potato genotypes expressing extreme resistance to PVX. *Phytopathology* **85**, 1003–1010.

Quesniaux, V., Briand, J.-P. and van Regenmortel, M.H.V. (1983a). Immunochemical studies of turnip yellow mosaic virus: II. Localisation of a viral epitope in the N-terminal residues of the coat protein. *Mol. Immunol.* **20**, 179–185.

Quesniaux, V., Jaegle, M. and van Regenmortel, M.H.V. (1983b). Immunological studies of turnip yellow mosaic virus: III. Localisation of two viral epitopes in residues 57–64 and 183–189 of the coat protein. *Biochim. Biophys. Acta* **743**, 226–231.

Quiot, J.B., Devergne, J.C., Marchoux, G., Cardin, L. and Douine, L. (1979a). Ecology and epidemiology of cucumber mosaic virus (CMV) in South East France. VI. Distribution of two CMV groups in weeds. *Ann. Phytopathol.* **11**, 349–357.

Quiot, J.B., Devergne, J.C., Cardin, L., Verbrugge, M., Marchoux, G. and Labonne, G. (1979b). Ecology and epidemiology of cucumber mosaic virus in the south-east of France. VII. Occurrence of two virus populations in various crops. *Ann. Phytopathol.* **11**, 359–373.

Raccah, B., Blanc, S. and Huet, H. (2001). Molecular basis of vector transmission: Potyvirus. In: K. Harris, J.E. Duffus and O.P. Smith (eds) *Virus–Insect–Plant Interactions*. Academic Press, San Diego (in press).

Rackwitz, H.-R., Rohde, W. and Sänger, H.L. (1981). DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature (Lond.)* **291**, 297–301.

Radford, J.E. and White, R.G. (1998). Localization of a myosin-like protein to plasmodesmata. *Plant J.* **14**, 743–750.

Raga, I.N., Ito, K., Matsui, M. and Okada, M. (1988). Effects of temperature on adult longevity, fertility and rate of transovarial passage of rice stripe virus in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* Fallen (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.* **23**, 67–75.

Ragetli, H.W.J., Weintraub, M. and Elder, M. (1973). Effective mechanical inoculation of plant viruses in the absence of water. *Can. J. Bot.* **51**, 1977–1981.

Raggi, V. (1998). Hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation in TMV-infected tobacco showing systemic acquired resistance to powdery mildew. *J. Phytopathol.* **146**, 321–325.

Raghavendra, K., Adams, M.L. and Schuster, T.M. (1985). Tobacco mosaic virus protein aggregates in solution: structural comparison of 20S aggregates with those near conditions for disk crystallisation. *Biochemistry* **24**, 3298–3304.

Raghavendra, K., Salunke, D.M., Caspar, D.L.D. and Schuster, T.M. (1986). Disk aggregates of tobacco mosaic virus protein in solution: electron microscopy observations. *Biochemistry* **25**, 6276–6279.

Ralph, R.K. and Wojcik, S.J. (1966). Synthesis of double-stranded viral RNA by cell-free extracts from turnip yellow mosaic virus-infected leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 347–361.

Ralph, R.K., Matthews, R.E.F., Matus, A.I. and Mandel, H.G. (1965). Isolation and properties of double-stranded RNA from virus infected plants. *J. Mol. Biol.* **11**, 202–212.

Ramírez, B.-C. and Haenni, A.-L. (1994). Molecular biology of tenuiviruses, a remarkable group of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **75**, 467–475.

Ramírez, B.-C., Macaya, G., Calvert, L.A. and Haenni, A.-L. (1992). Rice hoja blanca virus genome characterization and expression *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **74**, 2463–2468.

Randles, I.W. and Francki, R.I.B. (1972). Infectious nucleocapsid particles of lettuce necrotic yellows virus with RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology* **50**, 297–300.

Randles, J.W., Harrison, B.D., Murant, A.F. and Mayo, M.A. (1977). Packaging and biological activity of the two essential RNA species of tomato black ring virus. *J. Gen. Virol.* **36**, 187–193.

Randles, J.W., Chu, P.W.G., Dale, J.L. *et al.* (2000). Genus *Nanovirus*. In: M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner (eds) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 303–309. Academic Press, San Diego.

Ranki, M., Palva, A., Virtanen, M., Laaksonen, M. and Soderlund, H. (1983). Sandwich hybridization as a convenient method for detection of nucleic acids in crude samples. *Gene* **21**, 77–85.

Rao, A.L.N. (1997). Molecular studies on bromovirus capsid protein: III. Analysis of cell-to-cell movement competence of coat protein defective variants of cowpea chlorotic mottle virus. *Virology* **232**, 385–395.

Rao, A.L.N. and Francki, R.I.B. (1981). Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. VI. Partial compatibility of genome segments from the two viruses. *Virology* **114**, 573–575.

Rao, A.L.N. and Francki, R.I.B. (1982). Distribution of determinants for symptom production and host range on the three RNA components of cucumber mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **61**, 197–205.

Rao, A.L.N. and Grantham, G.L. (1996). Molecular studies on bromovirus capsid protein: II. Functional analysis of the amino-terminal arginine-rich motif and its role in encapsidation, movement and pathology. *Virology* **226**, 294–305.

Rao, A.L.N. and Hall, T.C. (1993). Recombination and polymerase error facilitates restoration of infectivity in brome mosaic virus. *J. Virol.* **67**, 969–979.

Rao, A.L.N. and Hiruki, C. (1987). Unilateral compatibility of genome segments from two distinct strains of red clover necrotic mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **68**, 191–194.

Rao, A.L.N., Hatta, T. and Francki, R.I.B. (1982). Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. VII. Serological relationships reinvestigated. *Virology* **116**, 318–326.

Rao, A.L.N., Dreher, T.W., Marsh, L.E. and Hall, T.C. (1989). Telomeric function of the tRNA-like structure of brome mosaic virus RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 5335–5339.

Rao, G.P., Shukla, K. and Gupta, S.N. (1987). Effect of cucumber mosaic virus infection on modulation, nodular physiology and nitrogen fixation of pea plants. *J. Plant Dis. Prot.* **94**, 606–613.

Rao, R.D.V.J.P. and Yaraguntiah, R.C. (1976). Natural occurrence of potato virus Y on *Datura metel*. *Curr. Sci.* **45**, 467.

Rappaport, I. and Siegel, A. (1955). Inactivation of tobacco mosaic virus by rabbit antiserum. *J. Immunol.* **74**, 106–116.

Rappaport, I. and Wildman, S.G. (1957). A kinetic study of local lesion growth on *Nicotiana glutinosa* resulting from tobacco mosaic virus infection. *Virology* **4**, 265–274.

Rappaport, I. and Wu, J.-H. (1963). Activation of latent virus infection by heat. *Virology* **20**, 472–476.

Raski, D.J. and Hewitt, W.B. (1963). Plant-parasitic nematodes as vectors of plant viruses. *Phytopathology* **53**, 39–47.

Raski, D.J., Goheen, A.C., Lider, L.A. and Meredith, C.P. (1983). Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant Dis.* **67**, 335–339.

Rasochová, L. and Miller, W.A. (1996). Satellite RNA of barley yellow dwarf-RPV virus reduces accumulation of RPV helper virus RNA and attenuates RPV symptoms in oats. *Mol. Plant Microb. Interact.* **9**, 646–650.

Rasochová, L., Passmore, B.K., Falk, B.W. and Miller, W.A. (1997). The satellite RNA of barley yellow dwarf virus-RPV is supported by beet western yellows virus in dicotyledonous protoplasts and plants. *Virology* **231**, 182–191.

Rast, A.T.B. (1967a). Yield of glasshouse tomatoes as affected by strains of tobacco mosaic virus. *Neth. J. Plant Pathol.* **73**, 147–156.

Rast, A.T.B. (1967b). Differences in aggressiveness between TMV-isolates from tomato on clones of *Lycopersicum peruvianum*. *Neth. J. Plant Pathol.* **73**, 186–189.

Rast, A.T.B. (1975). Variability of tobacco mosaic vines in relation to control of tomato mosaic in glasshouse tomato crops by resistance breeding and cross protection. *Agric. Res. Rep. (Wageningen)* **834**, 1–76.

Ratcliff, F., Harrison, B.D. and Baulcombe, D.C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**, 1558–1560.

Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A. and Baulcombe, D.C. (1999). Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* **11**, 1207–1215.

Rathjen, J.P., Karageirgos, L.E., Habili, N., Waterhouse, P.M. and Symons, R.H. (1994). Soybean dwarf virus contains the third variant genome type in the luteovirus group. *Virology* **198**, 671–679.

Raybould, A.F., Maskell, A.F., Edwards, M.L., Cooper, J.I. and Gray, A.J. (1999). The prevalence and spatial distribution of viruses in natural populations of *Brassica oleracea*. *New Phytol.* **141**, 265–275.

Ready, M.P., Brown, D.T. and Robertus, J.D. (1986). Extracellular localization of pokeweed antiviral protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 5053–5056.

Real, L.A. and McElhany, P. (1996). Spatial pattern and process in plant–pathogen interactions. *Ecology* **77**, 1011–1025.

Reddick, B.B., Habera, L.F. and Law, M.D. (1997). Nucleotide sequence and taxonomy of maize chlorotic dwarf virus within the Sequiviridae. *J. Gen. Virol.* **78**, 1165–1174.

Reddy, D.V.R. and Black, L.M. (1973). Electrophoretic separation of all components of the double-stranded RNA of wound tumor virus. *Virology* **54**, 557–562.

Reddy, D.V.R. and Black, L.M. (1974). Deletion mutations of the genome segments of wound tumor virus. *Virology* **61**, 458–473.

Reddy, D.V.R. and Black, L.M. (1977). Isolation and replication of mutant populations of wound tumor virions lacking certain genome segments. *Virology* **80**, 336–346.

Reddy, D.V.R. and MacLeod, R. (1976). Polypeptide components of wound tumor virus. *Virology* **70**, 274–282.

Reddy, D.V.R. and Richins, D.R. (1999). Plant pararetroviruses—legume caulimoviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1289–1292. Academic Press, San Diego.

Reddy, D.V.R., Delfosse, P. and Mayo, M.A. (1999). Pecluviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1196–1200. Academic Press, San Diego.

Reeck, G.R., de Hahn, C., Teller, D.C. *et al.* (1987). 'Homology' in proteins and nucleic acids: a terminology muddle and a way out of it. *Cell* **50**, 667.

Rees, M.W. and Short, M.N. (1965). Variations in the composition of two strains of tobacco mosaic virus in relation to their host. *Virology* **26**, 596–602.

Rees, M.W. and Short, M.N. (1982). The primary structure of cowpea chlorotic mottle virus coat protein. *Virology* **119**, 500–503.

Rees, M.W., Short, M.N. and Kassanis, B. (1970). The amino acid composition, antigenicity, and other characteristics of the satellite viruses of tobacco necrosis virus. *Virology* 40, 448–461.

Register, J.C. and Beachy, R.N. (1988). Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology* **166**, 524–532.

Register, J.C., III, and Beachy, R.N. (1989). Effects of protein aggregation state on coat proteinmediated protection against tobacco mosaic virus using a transient protoplast assay. *Virology* **173**, 656–663.

Register, J.C. and Nelson, R.S. (1992). Early events in plant virus infections: relationships with genetically engineered protection and host gene resistance. *Semin. Virol.* **3**, 441–451.

Register, J.C., Powell, P.A., Nelson, R.S. and Beachy, R.N. (1988). Genetically engineered cross protection against TMV interferes with initial infection and long distance spread of the virus. In: B. Staskawicz, P. Ahlquist and O. Yoder (eds) *Molecular Biology of Plant–Pathogen Interactions*, pp. 269–282. Alan R. Liss, New York.

Reichel, C. and Beachy, R.N. (1998). Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 11169–11174.

Reichel, C. and Beachy, R.N. (2000). Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *J. Virol.* **74**, 3330–3337.

Reichel, C., Más, P. and Beachy, R.N. (1999). The role of ER and cytoskeleton in plant viral trafficking. *Trends Plant Sci.* **4**, 458–462.

Reichenbächer, D., Kalinina, I., Schulze, M., Hom, A. and Kleinhempel, H. (1984). Ultramicro ELISA with a fluorogenic substrate for detection of potato viruses. *Potato Res.* **27**, 353–364.

Reichmann, J.L., Laín, S. and García, J.A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* **73**, 1–16.

Reid, M.S. and Matthews, R.E.F. (1966). On the origin of the mosaic induced by turnip yellow mosaic virus. *Virology* **28**, 563–570.

Reijnders, L., Sloof, P. and Borst, P. (1973). The molecular weights of the mitochondrial–ribosomal RNAs of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur. J. Biochem.* **35**, 266–269.

Reijnders, L., Aalbers, A.M.J., van Kammen, A. and Thuring, R.W.J. (1974). Molecular weights of plant viral RNAs determined by gel electrophoresis under denaturing conditions. *Virology* **60**, 515–521.

Reimann-Philipp, U. and Beachy, R,N, (1993). The mechanism(s) of coat protein-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Semin. Virol.* **4**, 349–356.

Reinero, A. and Beachy, R.N. (1986). Association of TMV coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves. *Plant Mol. Biol.* **6**, 291–301.

Ren, Q., Pfeiffer, T.W. and Ghabrial, S.A. (1997). Soybean mosaic virus incidence level and infection times: interaction effects on soybean. *Crop Sci.* **37**, 1706–1711.

Renaudin, J., Bové, J.M., Otsuki, Y. and Takebe, I. (1975). Infection of *Brassica* leaf protoplasts by turnip yellow mosaic virus. *Mol. Gen. Genet.* **141**, 59–68.

Resconich, E.C. (1963). Movement of tobacco necrosis virus in systemically infected soybeans. *Phytopathology* **53**, 913–916.

Restrepo-Hartwig, M.A. and Ahlquist, P. (1996). Brome mosaic virus helicase- and polymerase-like proteins colocalize on the endoplasmic reticulum at sites of viral RNA synthesis. *J. Virol.* **70**, 8908–8916.

Restrepo-Hartwig, M.A. and Ahlquist, P. (1999). Brome mosaic virus RNA replication proteins 1a and 2a colocalize and 1a independently localizes on the yeast endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **73**, 10303–10309.

Restrepo-Hartwig, M.A. and Carrington, J.C. (1992). Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *J. Virol.* **66**, 5662–5666.

Restrepo-Hartwig, M.A. and Carrington, J.C. (1994). The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *J. Virol.* **68**, 2388–2397.

Reusken, C.B.E.M. and Bol, J.F. (1996). Structural elements of the 3'-terminal coat protein binding site in alfalfa mosaic virus RNAs. *Nucl. Acids Res.* **24**, 2660–2665.

Reuzeau, C., McNally, J.G. and Pickard, B.G. (1997). The endomembrane sheath: a key structure for understanding the plant cell? *Protoplasma* **200**, 1–9.

Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T. and Maule, A.J. (1999). New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol. Plant Microb. Interact.* **12**, 367–376.

Revill, P.A., Davidson, A.D. and Wright, P.J. (1994). The nucleotide sequence and genome organization of mushroom bacilliform virus: a single-stranded RNA virus of *Agaricus bisporus* (Lange) Inbach. *Virology* **202**, 904–911.

Revill, P.A., Davidson, A.D. and Wright, P.J. (1998). Mushroom bacilliform virus: the initiation of translation at the 5' end of the genome and identification of the VPg. *Virology* **249**, 231–237.

Revill, P.A., Davidson, A.D. and Wright, P.J. (1999). Identification of a subgenomic mRNA encoding the capsid protein of mushroom bacilliform virus, a single-stranded RNA mycovirus. *Virology* **260**, 273–276.

Rezaian, M. (1990). Australian grapevine viroid—evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1813–1818.

Rezaian, M.A. and Francki, R.I.B. (1973). Replication of tobacco ringspot virus: I. Detection of a low-molecular-weight double-stranded RNA from infected plants. *Virology* **56**, 238–249.

Rezaian, M.A. and Symons, R.H. (1986). Anti-sense regions in satellite RNA of cucumber mosaic virus form stable complexes with the viral coat protein gene. *Nucl. Acids Res.* **14**, 3229–3239.

Rezaian, M.A., Francki, R.I.B., Chu, P.W.G. and Hatta, T. (1976). Replication of tobacco ringspot virus: III. Site of virus synthesis in cucumber cotyledon cells. *Virology* **74**, 481–488.

Rezaian, M.A., Williams, R.H.V. and Symons, R.H. (1985). Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA1: presence of a sequence complementary to part of the viral satellite RNA and homologies with other viral RNAs. *Eur. J. Biochem.* **150**, 331–339.

Rezaian, M.A., Skene, K.G.M. and Ellis, J.G. (1988). Anti-sense RNAs of cucumber mosaic virus in transgenic plants assessed for control of the virus. *Plant. Mol. Biol.* **11**, 463–471.

Rezelman, G., Goldbach, R. and van Kammen, A. (1980). Expression of bottom component RNA of cowpea mosaic virus in cowpea protoplasts. *J. Virol.* **36**, 366–373.

Rezelman, G., Franssen, H.J., Goldbach, R.W., Ie, T.S. and van Kammen, A. (1982). Limits to the independence of bottom component RNA of cowpea mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **60**, 335–342.

Rezelman, G., van Kammen, A. and Wellink, J. (1989). Expression of cowpea mosaic virus mRNA in cowpea protoplasts. *J. Gen. Virol.* **70**, 3043–3050.

Rhee, Y., Tzfira, T., Chen, M.-H., Waigmann, E. and Citovsky, V. (2000). Cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus: enigmas and explanations. *Mol. Plant Pathol.* **1**, 33–39.

Rhodes, J.D., Thain, J.F. and Wilden, D.C. (1999). Evidence for physically distinct signalling pathways in the wounded plant. *Ann. Bot.* **84**, 109–116.

Rice, R.H. (1974). Minor protein components in cowpea chlorotic mottle virus and satellite of tobacco necrosis virus. *Virology* **61**, 249–255.

Richards, K.E., and Williams, R.C. (1976). Assembly of tobacco mosaic virus *in vitro*. *Compr. Virol.* **6**, 1–37.

Richards, K.E., Jonard, G., Jacquemond, M. and Lot, H. (1978). Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus-associated RNA5. *Virology* **89**, 395–408.

Richards, K.E., Guilley, H. and Jonard, G. (1981). Further characterization of the discontinuities in cauliflower mosaic virus DNA. *FEBS Lett.* **134**, 67–70.

Richards, O.W. and Davies, R.G. (1994). *Imms General Textbook of Entomology*, 10th edn. Chapman and Hall, London.

Richardson, J. and Sylvester, E.S. (1968). Further evidence of multiplication of sowthistle yellow vein virus in its aphid vector *Hyperomyzus lactucae*. *Virology* **35**, 347–355.

Richert-Pöggeler, K.R. and Shepherd, R.J. (1997). Petunia vein-clearing virus: a plant pararetrovirus with the core sequences of an integrase function. *Virology* **236**, 137–146.

Richert-Pöggeler, K.R. and Shepherd, R.J. (1998). Petunia vein-clearing virus: a plant pararetrovirus with the core sequences for an integrase function. *Virology* **236**, 137–146.

Richter, T.E. and Ronald, P.C. (2000). The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol. Biol.* **42**, 195–204.

Riesner, D. (1987). Viroid function: subcellular location and *in situ* association with cellular components. In: T.O. Diener (ed.) *The Viroids*, pp. 99–116. Plenum Press, New York.

Riesner, D., Henco, K., Rokohl, U. *et al.* (1979). Structure and structure formation of viroids. *J. Mol. Biol.* **133**, 85–115.

Riesner, D., Colpan, M., Goodman, T.C., Nagel, L., Schumacher, J. and Steger, G. (1983). Dynamics and interactions of viroids. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1**, 669–688.

Riesner, D., Fels, A., Repsilber, D. *et al.* (1999) Structural motifs involved in replication and pathogenicity of potato spindle tuber viroid. Abstract in XI International Congress of Virology, Sydney, Australia. p. 29.

Ritter, E., Debener, T., Barone, A., Salamini, F. and Gebhardt, C. (1991). RFLP mapping of potato chromosomes of two gene controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol. Gen. Genet.* **227**, 81–85.

Rivera-Bustamente, R.F. and Semancik, J.S. (1989). Properties of a viroid-replicating complex solubilized from nuclei. *J. Gen. Virol.* **70**, 2707–2716.

Rizvi, S.A.H. and Raman, K.V. (1983). Effect of glandular trichomes on the spread of potato virus Y (PVY) and potato leaf roll virus (PLRV) in the field. In: W.J. Hooker (ed.) *Proceeding of the International Congress on Research for the Potato in the Year 2000*, pp. 162–163. International Potato Centre, Lima, Peru.

Rizzo, T.M. and Palukaitis, P. (1988). Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA2. *J. Gen. Virol.* **69**, 1777–1787.

Rizzo, T.M. and Palukaitis, P. (1989). Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA1. *J. Gen. Virol.* **70**, 1–11.

Rizzo, T.M. and Palukaitis, P. (1990). Construction of full-length cDNA clones of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2, and 3: generation of infectious transcripts. *Mol. Gen. Genet.* **222**, 249–256.

Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manifacier, S. and CasseDelbart, F. (1989). Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.* **70**, 935–947.

Robbins, M.A., Witsenboer, H., Michelmore, R.W., Laliberte, J.-F. and Fortin, M.G. (1994). Genetic mapping of turnip mosaic virus resistance in *Lactuca sativa*. *Theor. Appl. Genet.* **89**, 583–589.

Robbins, M.A., Reade, R.D. and Rochon, D.M. (1997). A cucumber necrosis virus variant deficient in fungal transmissibility contains an altered coat protein shell domain. *Virology* **234**, 138–146.

Robert, Y. (1999). Epidemiology of potato leafroll disease. In: H.G. Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp. 221-231. CAB International, Wallingford, UK.

Robert, Y. and Lemaire, O. (1999a). Introduction to luteovirus disease epidemiology. In: H.G. Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp. 211–220. CAB International, Wallingford, UK.

Robert, Y. and Lemaire, O. (1999b). Epidemiology and control strategies. In: H.G. Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp. 211–279. CAB International, Wallingford, UK

Roberts, A., Santa Cruz, S., Roberts, I.M., Prior, D.A.M., Turgeon, R. and Oparka, K. (1997). Phloem-unloading in sink leaves of *Nicotaina benthamiana*: comparison of fluorescent solute with fluorescent virus. *Plant Cell* **9**, 1381–1396.

Roberts, D.A. (1982). Systemic acquired resistance induced in hypersensitive plants by non-necrotic localized viral infections. *Virology* **122**, 207–209.

Roberts, D.A., Christie, R.G. and Archer, M.C. (1970). Infection of apical initials in tobacco shoot meristems by tobacco ringspot virus. *Virology* **42**, 217–220.

Roberts, F.M. (1950). The infection of plants by viruses through roots. *Ann. Appl. Biol.* **37**, 385–396.

Roberts, I.M. (1986). Practical aspects of handling, preparing and staining samples containing planta virus particles for electron microscopy. In: R.A.C. Jones and L. Torrance (eds) *Developments and Applications in Virus Testing. Dev. Appl. Biol.*, **I**, pp. 213–243. Association of Applied Biologists, Wellesbourne.

Roberts, I.M. (1988). The structure of particles of tobacco ringspot nepovirus: evidence from electron microscopy. *J. Gen. Virol.* **69**, 1831–1840.

Roberts, I.M. and Brown, D.J.F. (1980). Detection of six nepoviruses in their nematode vectors by immunosorbent electron microscopy. *Ann. Appl. Biol.* **96**, 187–192.

Roberts, I.M. and Harrison, B.D. (1979). Detection of potato leafroll and potato mop top viruses by immunosorbent electron microscopy. *Ann. Appl. Biol.* **93**, 289–297.

Roberts, I.M., Robinson, D.J. and Harrison, B.D. (1984). Serological relationships and genome homologies among geminiviruses. *J. Gen. Virol.* **65**, 1723–1730.

Roberts, I.M., Wang, D., Findlay, K. and Maule, A.J. (1998). Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* **245**, 173–181.

Roberts, P.L. and Wood, K.R. (1981). Methods for enhancing the synchrony of cucumber mosaic virus replication in tobacco plants. *Phytopathol. Z.* **102**, 114–121.

Roberts, S. and Stanley, J. (1994). Lethal mutations within the conserved stem-loop of African cassava mosaic virus DNA are rapidly corrected by genomic recombination. *J. Gen. Virol.* **75**, 3203–3209.

Robertson, A.D. (1987). The whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) as a vector of African cassava mosaic virus at the Kenya coast and ways in which the yield losses in cassava, *Manihot esculenta* Crantz, caused by the virus can be reduced. *Insect Sci. Appl.* **8**, 797–801.

Robertson, H.D. and Branch, A.D. (1987). The viroid replication process. In: J.S. Semancik (ed.) *Viroids and Viroid-like Pathogens*, pp. 49–69. CRC Press, Boca Raton, FL.

Robertson, N.L. and Carroll, T.W. (1988). Virus-like particles and spider mite intimately associated with a new disease of barley. *Science* **240**, 1188–1190.

Robertson, W.M. and Henry, C.E. (1986). An association of carbohydrates with particles of arabis mosaic virus retained within *Xiphinema diversicaudatum*. *Ann. Appl, Biol.* **109**, 299–305.

Robinson, D.J. (1973). Inactivation and mutagenesis of tobacco rattle virus by nitrous acid. *J. Gen. Virol.* **18**, 215–222.

Robinson, D.J. (1977). A variant of tobacco rattle virus: evidence for a second gene in RNA2. *J. Gen. Virol.* **35**, 37–43.

Robinson, D.J. and Murant, A.F. (1999). Umbraviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1855–1859. Academic Press, San Diego.

Robinson, D.J. and Romero, J. (1991). Sensitivity and specificity of nucleic acid probes for potato leafroll detection. *J. Virol. Methods* **34**, 209–219.

Robinson, D.J., Barker, H., Harrison, B.D. and Mayo, M.A. (1980). Replication of RNA1 of tomato black ring virus independently of RNA2. *J. Gen. Virol.* **51**, 317–326.

Robinson, D.J., Mayo, M.A., Fritsch, C., Jones, A.T. and Raschke, J.H. (1983). Origin and messenger activity of two small RNA species found in particles of tobacco rattle virus strain SYM. *J. Gen. Virol.* **64**, 1591–1599.

Robinson, D.J., Ryabov, E.V., Raj, S.K., Roberts, I.M. and Taliansky, M.E. (1999). Satellite RNA is essential for encapsidation of groundnut rosette umbravirus RNA by groundnut rosette assistor luteovirus coat protein. *Virology* **254**, 106–114.

Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F., Lastra, R. *et al.* (1995). Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Dis.* **79**, 437–444.

Rochon, D'A.M. (1999). Tombusviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1789–1798. Academic Press, San Diego.

Rochon, D'A.M., Kelly, R. and Siegel, A. (1986). Encapsidation of 18S RNA by tobacco mosaic virus coat protein. *Virology* **150**, 140–148.

Rochow, W.F. (1970). Barley yellow dwarf virus: phenotypic mixing and vector specificity. *Science* **167**, 875–878.

Rochow, W.F. (1979). Field variants of barley yellow dwarf virus: detection and fluctuation during twenty years. *Phytopathology* **69**, 655–660.

Rochow, W.F. and Duffus, J.E. (1978). Relationship between barley yellow dwarf and beet western yellows viruses. *Phytopathology* **68**, 51–58.

Rochow, W.F. and Muller, I. (1975). Use of aphids injected with virus-specific antiserum for study of plant viruses that circulate in vectors. *Virology* **63**, 282–286.

Rodi, D.J. and Makowski, L. (1999). Phage-display technology—finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 87–93.

Rodríguez, L.L. and Nichol, S.T. (1999). Vesicular stomatitis viruses (*Rhabdoviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, pp. 1910–1919. Academic Press, San Diego.

Rodríguez-Cerezo, E. and García-Arenal, F. (1989). Genetic heterogeneity of the RNA genome population of the plant virus U5-TMV. *Virology* **170**, 418–423.

Rodríguez-Cerezo, E., Moya, A. and García-Arenal, F. (1989). Variability and evolution of the plant RNA virus pepper mild mottle virus. *J. Virol.* **63**, 2189–2203.

Rodríguez-Cerezo, E., Klein, P.G. and Shawe, J.G. (1991a). A determinant of disease symptom severity is located in the 3′-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 9863–9867.

Rodríguez-Cerezo, E., Fernandez-Elena, S., Moya, A. and García-Arenal, F. (1991b). High genetic stability in natural populations of the plant virus tobacco mild green mosaic virus. *J. Mol. Evol.* **32**, 328-332.

Roenhorst, J.W., van Lent, J.W.M. and Verdium, B.J.M. (1988). Binding of cowpea chlorotic mottle virus to cowpea protoplasts and relation of binding to virus entry and expression. *Virology* **164**, 91–98.

Roenhorst, J.W., Verdiun, B.J.M. and Goldbach, R.W. (1989). Virus–ribosome complexes from cell-free translation systems supplemented with cowpea chlorotic mottle virus particles. *Virology* **168**, 138–146.

Rogers, S.G., Bisaro, D.M., Horsch, R.B. *et al.* (1986). Tomato golden mosaic virus: a component DNA replicates autonomously in transgenic plants. *Cell (Camb.)* **45**, 593–600.

Rohozinski, J. and Hancock, J.M. (1996). Do light-induced pH changes within the chloroplast drive turnip yellow mosaic virus assembly? *J. Gen. Virol.* **77**, 163–165.

Roistacher, C.N., Dodds, J.A. and Bash, J.A. (1987). Means of obtaining and testing protective strains of seedling yellows and stem pitting tristeza virus: a preliminary report. *Phytophylactica* **19**, 199–203.

Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Russell, D.R. and Maxwell, D.P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* **77**, 340–347.

Romaine, C.P. (1999). Barnaviruses (*Barnaviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 152–154. Academic Press, San Diego.

Romaine, C.P. and Zaitlin, M. (1978). RNA-dependent RNA polymerases in uninfected and tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves: viral-induced stimulation of a host polymerase activity. *Virology* **86**, 241–253.

Romaine, C.P., Newhart, S.R. and Anzola, D. (1981). Enzyme-linked immunosorbent assay for plant viruses in intact leaf tissue disks. *Phytopathology* **71**, 308–312.

Romero, J., Dzianott, A.M. and Bujarski, J.J. (1992). The nucleotide sequence and genome organization of RNA2 and RNA3 segments of broad bean mottle virus. *Virology* **187**, 671–681.

Romero, J., Huang, Q., Pogany, J. and Bujarski, J.J. (1993). Characterization of defective interfering components that increase symptom severity of broad bean mottle virus infections. *Virology* **194**, 576–584.

Romero-Durbán, J., Cambra, M. and Duran-Vila, N. (1995). A simple imprint-hybridization method for detection of viroids. *J. Virol. Methods* **55**, 37–47.

Ronald, W.P., Schroeder, B., Tremaine, J.H. and Paliwal, Y.C. (1977). Distorted virus particles in electron microscopy: an artifact of grid films. *Virology* **76**, 416–419.

Ronald, W.P., Tremaine, J.H. and MacKenzie, D.J. (1986). Assessment of southern bean mosaic virus monoclonal antibodies for affinity chromatography. *Phytopathology* **76**, 491–494.

Rønde Kristensen, H. (1983). European fights against fruit tree viruses as organised by EPPO and EEC. *Acta Hortic.* **130**, 19–29.

Roossinck, M. (1997). Mechanisms of plant virus evolution. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 191–209.

Roossinck, M.J. (1999a). Cucumoviruses (*Bromoviridae*)—general features. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 315–320. Academic Press, San Diego.

Roossinck, M.J. (1999b). Cucumoviruses (*Bromoviridae*)—molecular biology. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 320–324. Academic Press, San Diego.

Roossinck, M.J. (2001). Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. *Molec. Plant Pathol.* **2**, 59–63.

Roossinck, M.J. and Palukaitis, P. (1990). Rapid induction and severity of symptoms in zucchini squash (*Cucurbita pepo*) map to RNA1 of cucumber mosaic virus. *Mol. Plant Microb. Interact.* **3**, 188–192.

Roossinck, M.J., Sleat, D. and Palukaitis, P. (1992). Satellite RNAs of plant viruses: Structures and biological effects. *Microbiol. Rev.* **56**, 265–279.

Roossinck, M.J., Zhang, L. and Hellwald, K.-H. (1999). Rearrangements in the 5′ nontranslated region and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *J. Virol.* **73**, 6752–6758.

Rose, D.J.W. (1974). The epidemiology of maize streak disease in relation to population densities of *Cicadulina* spp. *Ann. Appl. Biol.* **76**, 199–207.

Rosell, R.C., Lichty, J.E. and Brown, J.K. (1995). Ultrastructure of the mouthparts of adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **24**, 297–306.

Rosell, R.C., Torres-Jerez, I. and Brown, J.K. (1999). Tracing the geminivirus–whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph and honeydew. *Phytopathology* **89**, 239–246.

Rosner, A., Maslenin, L. and Spiegel, S. (1998). Differentiation among isolates of prunus necrotic ringspot virus by transcript conformation polymorphism. *J. Virol. Methods* **74**, 109–115.

Rosner, A., Maslenin, L. and Spiegel, S. (1999). Double-stranded conformation polymorphism of heterologous RNA transcripts and its use for virus strain differentiation. *Plant Pathol.* **48**, 235–239.

Ross, A.F. (1941). The concentration of alfalfa mosaic virus in tobacco plants at different periods of time after inoculation. *Phytopathology* **31**, 410–421.

Ross, A.F. (1961a). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* **14**, 329–339.

Ross, A.F. (1961b). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**, 340–358.

Ross, A.F. (1966). Systemic effects of local lesion formation. In: A.B.R. Beemster and J. Dijkstra (eds) *Viruses of Plants*, pp. 127–150. North-Holland, Amsterdam.

Ross, A.F. and Williamson, C.E. (1951). Physiologically active emanations from virus-infected plants. *Phytopathology* **41**, 431–438.

Ross, J.P. and Butler, A.K. (1985). Distribution of bean pod mottle virus in soybeans in North Carolina. *Plant Dis.* **69**, 101–103.

Rossmann, M.G. (1985). The structure and *in vitro* assembly of southern bean mosaic virus in relation to that of other small spherical plant viruses. In: J.W. Davies (ed.) *Molecular Plant Virology*, Vol. 1, pp. 123–153. CRC Press, Boca Raton.

Rossmann, M.G. and Rueckert, R.R. (1987). What does the molecular structure of viruses tell us about viral functions? *Microbiol. Sci.* **4**, 206–214.

Rossmann, M.G. and Tao, Y.Z. (1999). Cryoelectron-microscopy reconstruction of partially symmetric objects. *J. Struct. Biol.* **125**, 196–208.

Rossmann, M.G., Abad-Zapatero, C., Murthy, M.R.N., Liljås, L., Alwyn-Jones, T. and Strandberg, B. (1983). Structural comparisons of some small spherical plant viruses. *J. Mol. Biol.* **165**, 711–736.

Rost, B., Sander, C. and Schneider, R. (1994). PHD: a mail server for the protein secondary structure prediction. *CA BIOS* **10**, 53–60.

Rothnie, H.M. (1996). Plant mRNA 3′-end formation. *Plant Molec. Biol.* **32**, 43–61.

Rothnie, H.M., Chapdelaine, Y. and Hohn, T. (1994). Pararetroviruses and retroviruses: a comparative review of viral structure and gene expression strategies. *Adv. Virus Res.* **44**, 1–67.

Rothnie, H.M., Chen, G., Fütterer, J. and Hohn, T. (2001). Polyadenylation in rice tungro bacilliform virus: *cis*-acting signals and regulation. *J. Virol.* **75**, 4148–4194.

Rottier, P.J.M., Rezelman, G. and van Kammen, A. (1980). Protein synthesis in cowpea mosaic virus-infected cowpea protoplasts: detection of virus-related proteins. *J. Gen. Virol.* **51**, 359–379.

Rouleau, M., Smith, R.J., Bancroft, J.B. and Mackie, G.A. (1994). Purification, properties, and subcellular localization of foxtail mosaic potexvirus 26-kDa protein. *Virology* **204**, 254–265.

Round, F.E. (1984). The systematics of the Chlorophyta: an historical review leading to some modern concepts (Taxonomy of the Chlorophyta)—III. In: D.E.G. Irvine and D.M. John (eds) *Systematics of the Green Algae*, pp. 1–27. Academic Press, Orlando, FL.

Rouppe van der Voort, J., Lindeman, W., Folkertsma, R. *et al.* (1998). A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera* spp.) maps to a resistance gene cluster in potato. *Theor. Appl. Genet.* **96**, 654–661.

Rouppe van der Voort, J., Kanyuka, K., van der Vossen, E. *et al.* (1999). Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into cultivated potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 197–206.

Rouzé-Jouan, J., Terradot, L., Pasquer, F., Tanguy, S. and Ducray-Bourdin, D.G. (2001). The passage of potato leafroll virus through *Myzus persicae* gut membrane regulates transmission efficiency. *J. Gen. Virol.* **82**, 17–23.

Rowhani, A., Mircetich, S.M., Shepherd, R.J. and Cucuzza, J.D. (1985). Serological detection of cherry leafroll virus in English walnut trees. *Phytopathology* **75**, 48–52.

Roy, B.P., AbouHaidar, M.G. and Alexander, A. (1989). Biotinylated RNA probes for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTV) in plants. *J. Virol. Methods* **23**, 149–156.

Rubino, L. and Russo, M. (1997). Molecular analysis of Pothos latent virus genome. *J. Gen. Virol.* **78**, 1219–1226.

Rubino, L., Tousignant, M.E. and Steger, G. and Kaper, J.M. (1990). Nucleotide sequence and structural analysis of two satellite RNAs associated with chicory yellow mottle virus (CYMV). *J. Gen. Virol.* **71**, 1897–1903.

Rubino, L., Russo, M. and Martelli, G.P. (1995). Sequence analysis of the Pothos latent virus genomic RNA. *J. Gen. Virol.* **76**, 2835–2839.

Rubino, L., DiFranco, A. and Russo, M. (2000). Expression of a plant virus non-structural protein in *Saccharomyces cerevisiae* causes membrane proliferation and altered mitochondrial morphology. *J. Gen. Virol.* **81**, 279–286.

Rubino, L., Weber-Lotfi, F., Dietrich, A., Stussi-Garroud, C. and Russo, M. (2001). The open reading frame 1– encoded (36K) protein of carnation etched ring virus localizes to mitochondria. *J. Gen. Virol.* **82**, 29–34.

Rubio, T., Borja, M., Scholthof, H.B., Feldstein, P.A., Morris, T.J. and Jackson, A.O. (1999). Broad-spectrum protection against tombusviruses elicited by defective interfering RNAs in transgenic plants. *J. Virol.* **73**, 5070–5078.

Rufty, R.C., Powell, N.T. and Gooding, G.V., Jr. (1983). Relationship between resistance to *Meloidogyne incognita* and a necrotic response to infection by a strain of potato virus Y in tobacco. *Phytopathology* **73**, 1418–1423.

Ruiz, M.T., Voinnet, O. and Baulcombe, D.C (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**, 937–946.

Rushing, R.E., Sunter, G., Gardiner, W.E., Dute, R.R. and Bisaro, D.M. (1987). Ultrastructural aspects of tomato golden mosaic virus infection in tobacco. *Phytopathology* **77**, 1231–1236.

Russell, G.E. (1958). Sugar beet yellows: a preliminary study of the distribution and interrelationships of viruses and virus strains found in East Anglia 1955–57. *Ann. Appl. Biol.* **46**, 393–398.

Russell, G.E. (1960). Breeding for resistance to sugar beet yellows. *Br. Sugar Beet Rev.* **28**, 163–170.

Russell, G.E. (1966). The control of *Alternaria* species on leaves of sugar beet infected with yellowing viruses. II. Experiments with two yellowing viruses and virus-tolerant sugar beet. *Ann. Appl. Biol.* **57**, 425–434.

Russo, M. and Martelli, G.P. (1972). Ultrastructural observations on tomato bushy stunt virus in plant cells. *Virology* **49**, 122–129.

Russo, M., Kishtah, A.A. and Martelli, G.P. (1979). Unusual intracellular aggregates of broad bean wilt virus particles. *J. Gen. Virol.* **43**, 453–456.

Russo, M., Di Franco, S. and Martelli, G.P. (1983). The fine structure of cymbidium ringspot virus infection in host tissues: 3. Role of peroxisomes in the genesis of multivesicular bodies. J. Ultrastuct. Res. **82**, 52–63.

Russo, M., Di Franco, A. and Martelli, G.P. (1987). Cytopathology in the identification and classification of tombusviruses. *Intervirology* **28**, 134–143.

Rutgers, T., Salerno-Rife, T. and Kaesberg, P. (1980). Messenger RNA for the coat protein of southern bean mosaic virus. *Virology* **104**, 506–509.

Ryabov, E.V., Oparka, K.J., Santa Cruz, A., Robinson, D.J. and Taliansky, M.E. (1998). Intracellular location of two groundnut rosette umbravirus proteins delivered by PVX and TMV vectors. *Virology* **242**, 303–313.

Ryabov, E.V., Robinson, D.J. and Taliansky, M.E. (1999). A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 1212–1217.

Ryabova, L.A. and Hohn, T. (2000). Ribosome shunting in the cauliflower mosaic virus 35S RNA leader is a special case of reinitiation of translation functioning in plant and animal systems. *Genes & Dev.* **14**, 817–829.

Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y. and Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**, 1809–1819.

Ryan, M.D. and Flint, M. (1997). Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *J. Gen. Virol.* **78**, 699–723.

Rybicki, E.P. (1994). A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of *Geminiviridae*. *Arch. Virol.* **139**, 49–77.

Rybicki, E.P. and von Wechmar, M.B. (1982). Enzyme-assisted immune detection of plant virus proteins electroblotted onto nitrocellulose paper. *J. Virol. Methods* **5**, 267–278.

Rydén, K. and Gerhardson, B. (1978). Rödklövermosaikvirus sprids med slättermaskiner. *Vaextskyddsnotiser* **42**, 112–115.

Ryder, E.J. (1964). Transmission of common lettuce mosaic virus through the gametes of the lettuce plant. *Plant Dis. Rep.* **48**, 522–523.

Sacher, R. and Ahlquist, P. (1989). Effect of deletions in the N-terminal basic arm of brome mosaic virus coat protein on RNA packaging and systemic infection. *J. Virol.* **63**, 4545–4552.

Sacher, R., French, R. and Ahlquist, P. (1988). Hybrid brome mosaic virus RNAs express and are packaged in tobacco mosaic virus coat protein *in vivo*. *Virology* **167**, 15–24.

Sadowy, E., Maasen, A., Juszczuk, M. *et al.* (2001a). The ORF0 product of potato leafroll virus is indispensable for virus accumulation. *J. Gen. Virol.* **82**, 1529–1532.

Sadowy, E., Juszczuk, M., David, C., Gronenborn, B. and Hulanicka, M.D. (2001b). Mutational analysis of the proteinase function of potato leafroll virus. *J. Gen. Virol.* **82**, 1517–1527.

Sägesser, R., Martinez, E., Tsagris, M. and Tabler, M. (1997). Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of a cDNA expression library. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3816–3822.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S. *et al.* (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491.

Saito, T., Meshi, T., Takamatsu, N. and Okada, Y. (1987a). Coat protein gene sequence of tobacco mosaic virus encodes a host response determinant. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 6074–6077.

Saito, T., Hosokawa, D., Meshi, T. and Okada, Y. (1987b). Immunocytochemical localization of the 130K and 180K proteins (putative replicase components) of tobacco mosaic virus. *Virology* **160**, 477–481.

Saito, T., Imai, Y., Meshi, T. and Okada, Y. (1988). Interviral homologies of the 30K proteins of tobamoviruses. *Virology* **167**, 653–656.

Saitou, N. and Nei, M. (1986). Polymorphism and evolution of influenza virus genes. *Mol. Biol. Evol.* **3**, 57–74.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.* **4**, 406–425.

Sakai, F. and Takebe, I. (1970). RNA and protein synthesis in protoplasts isolated from tobacco leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **224**, 531–540.

Sakai, F. and Takebe, I. (1974). Protein synthesis in tobacco mesophyll protoplasts induced by tobacco mosaic virus infection. *Virology* **62**, 426–433.

Sakai, F., Dawson, J.R.O. and Watts, J.W. (1979). Synthesis of proteins in tobacco protoplasts infected with brome mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **42**, 323–328.

Sakai, F., Dawson, J.R.O. and Watts, J.W. (1983). Interference in infections of tobacco protoplasts with two bromoviruses. *J. Gen. Virol.* **64**, 1347–1354.

Sako, N. and Ogata, K. (1980). Different helper factors associated with aphid transmission of some potyviruses. *Virology* **112**, 762–765.

Sakurai, T., Murai, T., Maeda, T. and Tsumuki, H. (1998). Sexual differences in transmission and accumulation of tomato spotted wilt virus in its insect vector *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Appl. Entomol. Zool.* **33**, 583–588.

Sala, M. and Wain-Hobson, S. (2000). Are RNA viruses adapting or merely changing? *J. Mol. Evol.* **51**, 12–20.

Salaman, R.N. (1933). Protective inoculation against a plant virus. *Nature (Lond.)* **131**, 468.

Salaman, R.N. (1938). The potato virus 'X', its strains and reactions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* **229**, 137–217.

Salánki, K., Carrère, I., Jacquemond, M., Balázs, E. and Tepfer, M. (1997). Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with cucumber mosaic virus and tomato aspermy virus. *J. Virol.* **71**, 3597–3602.

Salazar, L.F. (1999). Capilloviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, p. 222. Academic Press, San Diego.

Salazar, L.F. and Jones, R.A.C. (1975). Some studies on the distribution and incidence of potato mop-top virus in Peru. *Am. Potato J.* **52**, 143–150.

Salazar, L.F., Balbo, I. and Owens, R.A. (1988a). Comparison of four radioactive probes for the diagnosis of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization. *Potato Res.* **31**, 431–442.

Salazar, L.F., Hammond, R.W., Diener, T.O. and Owens, R.A. (1988b). Analysis of viroid replication following *Agrobacterium*-mediated inoculation of non-host species with potato spindle tuber viroid cDNA. *J. Gen. Virol.* **69**, 879–889.

Salazar, L.F., Querci, M., Bartolini, I. And Lazarte, V. (1995). Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia* **30**, 56–58.

Salerno-Rife, T., Rutgers, T. and Kaesberg, P. (1980). Translation of southern bean mosaic virus RNA in wheat germ embryo and rabbit reticulocyte extracts. *J. Virol.* **34**, 51–58.

Salinas Calvete, J. and Wieringa-Brants, D.H. (1984). Infection and necrosis of cowpea mesophyll cells by tobacco necrosis virus and two strains of tobacco mosaic virus. *Neth. J. Plant Pathol.* **90**, 71–78.

Salomon, R. (1999). The evolutionary advantage of breeding for tolerance over resistance against viral plant disease. *Israel J. Plant Sci.* **47**, 135–139.

Salvato, M.S. and Fraenkel-Conrat, H. (1977). Translation of tobacco necrosis virus and its satellite in a cell-free wheat germ system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 2288–2292.

Sama, S., Hasanuddin, A., Manwan, I., Cabunagan, R.C. and Hibino, H. (1991). Integrated management of rice tungro disease in South Sulawesi. *Crop Protect.* **10**, 34–40.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols 1–3, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Samuel, G. (1931). Some experiments on inoculating methods with plant viruses and on local lesions. *Ann. Appl. Biol.* **18**, 494–507.

Samuel, G. (1934). The movement of tobacco mosaic virus within the plant. *Ann. Appl. Biol.* **21**, 90–111.

Samuel, G. and Bald, J.G. (1933). On the use of primary lesions in queantitative work with two plant viruses. *Ann. Appl. Biol.* **20**, 70–99.

Sander, E.-M. and Dietzgen, R.G. (1984). Monoclonal antibodies against plant viruses. *Adv. Virus Res.* **29**, 131–168.

Sander, E.-M. and Mertes, G. (1984). Use of protoplasts and separate cells in plant virus research. *Adv. Virus Res.* **29**, 215–262.

Sander, E.-M., Dietzgen, R.G., Cranage, M.P. and Coombs, R.R.A. (1989). Rapid and simple detection of plant virus by reverse passive haemagglutination. I. Comparison of ELISA (enzymelinked immunosorbent assay) and RPH (reverse passive haemagglutination) for plant virus diagnosis. *J. Plant Dis. Prot.* **96**, 113–123.

Sanderfoot, A.A., Ingham, D.J and Lazarowitz, S.G. (1996). A viral movement protein as a nuclear shuttle: the geminiviral BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiol.* **110**, 23–33.

Sanders, P.R., Winter, J.A., Barnason, A.R., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. (1987). Comparison of cauliflower mosaic virus S35 and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucl. Acids Res.* **15**, 1543–1558.

Sanfaçon, H. (1992). Regulation of messenger RNA: lessons from the cauliflower mosaic virus transcription signals. *Can. J. Bot.* **70**, 885–899.

Sanfaçon, H. and Hohn, T. (1990). Proximity of the promoter inhibits recognition of cauliflower mosaic virus polyadenylation signal. *Nature* **346**, 81–84.

Sanford, J.C. and Johnson, S.A. (1985). The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasites own genome. *J. Theor. Biol.* **115**, 395–405.

Sangare, A., Deng, D., Fauquet, C.M. and Beachy, R.N. (1999). Resistance to African cassava mosaic virus conferred by a mutant of the putative NTP-binding domain of the *Rep* gene (AC1) in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Breeding* **5**, 95–102.

Sänger, H.L. (1969). Functions of the two particles of tobacco rattle virus. *J. Virol.* **3**, 304–312.

Sänger, H.L. (1987). Viroid function. Viroid replication. In: T.O. Diener (ed.) *The Viroids*, pp. 117–166. Plenum, New York.

Sänger, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J. and Kleinschmidt, A.K. (1976). Viroids are single stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **73**, 3852–3856.

Sanger, M., Daubert, S. and Goodman, R.M. (1990). Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant. Mol. Biol.* **14**, 433–443.

Sano, T., Kudo, H., Sugimoto, T. and Shikata, E. (1988). Synthetic oligonucleotide hybridization probes to diagnose hop stunt viroid strains and citrus exocortis viroid. *J. Virol. Methods* **19**, 109–120.

Sano, T., Candresse, T., Hammond, R.W., Diener, T.O. and Owens, R.A. (1992). Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 10104–10108.

Sano, Y., Wada, M., Hashimoto, Y., Matsumoto, T. and Kojima, M. (1998). Sequences of ten circular ssDNA components associated with the milk vetch dwarf virus genome. *J. Gen. Virol.* **79**, 3111–3118.

Santa Cruz, S. (1999). Perspective: phloem transport of viruses and macromolecules—what goes in must come out. *Trends Microbiol.* 7, 237–241.

Santa Cruz, S. and Baulcombe, D.C. (1993). Molecular analysis of potato virus X isolates in relation to the potato hypersensitivity gene *Nx*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**, 707–714.

Santa Cruz, S., Chapman, S., Roberts, A.G., Roberts, I.M., Prior, D.A.M. and Oparka, K.K. (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 6286–6290.

Santa Cruz, S., Roberts, A.G., Prior, D.A.M., Chapman, S. and Oparka, K.J. (1998). Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X. *Plant Cell* **10**, 495–510.

Sanz, A.I., Fraile, A., Gallego, J.M., Malpica, J.M. and García-Arenal, F. (1999). Genetic variability of natural populations of cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus. *J. Mol. Evol.* **49**, 672–681.

Sanz, A.I., Fraile, A., García-Arenal, F. *et al.* (2000). Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *J. Gen. Virol.* **81**, 1839–1849.

Sanz-Burgos, A.P. and Gutierrez, C. (1998). Organization of the *cis*-acting element required for wheat dwarf geminivirus DNA replication and visualization of a Rep protein-DNA complex. *Virology* **243**, 119–129.

Sarachu, A.N., Nassuth, A., Roosien, J., van Vloten-Doting, L. and Bol, J.F. (1983). Replication of temperature-sensitive mutants of alfalfa mosaic virus in protoplasts. *Virology* **125**, 64–74.

Sarachu, A.N., Huisman, M.J., van Vloten-Doting, L. and Bol, J.F. (1985). Alfalfa mosaic virus temperature-sensitive mutants: I. Mutants defective in viral RNA and protein synthesis. *Virology* **141**, 14–22.

Sargent, R.G., Brenneman, M.A and Wilson, J.H. (1997). Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 267–277.

Sarkar, S. (1969). Evidence of phenotypic mixing between two strains of tobacco mosaic virus. *Mol. Gen. Genet.* **105**, 87–90.

Sarkar, S. (1986). Tobacco mosaic virus: mutants and strains. In: M.H.V. van Regenmortel and H. Fraenkel-Conrat (eds) *The Plant Viruses*, Vol. 2, pp. 59–77. Plenum, New York.

Sastry, L., Alting-Mees, H., Huse, W.D. *et al.* (1989). Cloning of the immunological repertoire in *Escherichia coli* for generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy chain variable region-specific cDNA library. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 5728–5732.

Satapathy, M.K. (1998). Chemical control of insect and nematode vectors of plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 188–195. APS Press, St. Paul, MN.

Satoh, H., Matsuda, H., Kawamura, T., Isogai, M., Yoshikawa, N. and Takahashi, T. (2000). Intracellular distribution, cell-to-cell trafficking and tubule-inducing activity of the 50 kDa movement protein of apple chlorotic leafspot virus fused to green fluorescent protein. *J. Gen. Virol.* **81**, 2085–2093.

Saunders, K. and Stanley, J. (1999). A nanovirus-like DNA component associated with the yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology* 264, 142–152.

Saunders, K., Lucy, A.P. and Covey, S.N. (1989). Characterization of cDNA clones of host RNAs isolated from cauliflower mosaic virus-infected turnip leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **35**, 339–346.

Saunders, K., Lucy, A. and Stanley, J. (1991). DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucl. Acids Res.* **19**, 2325–2330.

Saunders, K., Bedford, I.D., Braden, R.W., Markham, P.G., Wong, S.M. and Stanley, J. (2000). A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 6890–6895.

Saunders, K., Wege, C., Veluthambi, K., Jeske, H. and Stanley, J. (2001a). The distinct disease phenotypes of the common and yellow vein strains of tomato golden mosaic virus are determined by nucleotide differences in the 3′-terminal region of the gene encoding the movement protein. *J. Gen. Virol.* **82**, 45–51.

Saunders, K. Bedford, I.D. and Stanley, J. (2001b). Pathogenicity of a natural recombinant associated with *Ageratum* yellow vein disease: implication for geminivirus evolution and disease aetiology. *Virology* **282**, 38–47.

Savithri, H.S. and Erickson, J.W. (1983). The self-assembly of the cowpea strain of southern bean mosaic virus: formation of $T = 1$ and $T = 3$ nucleoprotein particles. *Virology* **126**, 328–335.

Savithri, H.S., Munshi, S.K., Suryanarayana, S., Divakar, S. and Murthy, M.R.N. (1987). Stability of belladonna mottle virus particles: the role of polyamines and calcium. *J. Gen. Virol.* **68**, 1533–1542.

Sawiki, S.G. and Sawiki, D.L. (1998). A new model for coronavirus transcription. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 215–219.

Sawyer, L., Tollin, P. and Wilson, W.R. (1987). A comparison between the predicted secondary stnictures of potato virus X and papaya mosaic virus coat proteins. *J. Gen. Virol.* **68**, 1229–1232.

Saxena, R.C. and Khan, Z.R. (1985). Electronically recorded disturbances in feeding behaviour of *Nephotettix virescens* (Homoptera: Cicadellidae) on neem oil-treated rice plants. *J. Econ. Entomol.* **78**, 222–226.

Sayama, H., Sato, T., Kominato, M., Natsuaki, T. and Kaper, J.M. (1993). Field testing of a satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathology* **83**, 405–410.

Scalla, R., Boudon, E. and Rigaud, J. (1976) Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoretic detection of two high-molecular-weight proteins associated with tobacco mosaic virus infection in tobacco. *Virology* **69**, 339–345.

Scalla, R., Romaine, P., Asselin, A., Rigaud, J. and Zaitlin, M. (1978). An *in vivo* study of a nonstructural polypeptide synthesized upon TMV infection and its identification with a polypeptide synthesized *in vitro* from TMV RNA. *Virology* **91**, 182–193.

Schaad, M.C. and Carrington, J.C. (1996). Suppression of long-distance movement of tobacco etch virus in a nonsusceptible host. *J. Virol.* **70**, 2556–2561.

Schaad, M.C., Jensen, P.E. and Carrington, J.C. (1997a). Formation of plant RNA replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J.* **16**, 4049–4059.

Schaad, M.C., Lellis, A.D. and Carrington, J.C. (1997b). VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant of long-distance movement. *J. Virol.* **71**, 8624–8631.

Schaad, M.C., Anderberg, R.J. and Carrington, J.C. (2000). Strain-specific interaction of tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* **273**, 300–306.

Schachman, H.K. (1959). *Ultracentrifugation in Biochemistry*. Academic Press, New York.

Schade, R., Hlinak, A., Marburger, A. *et al.* (1997). Advantages of using egg yolk antibodies in life sciences: the results of five studies. *ALTA - Alternatives to Laboratory Animals* **25**, 555–586.

Schalk, H.-J., Matzeit, V., Schiller, B., Schell, J. and Gronenborn, B. (1989). Wheat dwarf virus, a geminivirus of graminaceous plants needs splicing for replication. *EMBO J.* **8**, 359–364.

Schärer-Hernández, N and Hohn, T. (1998). Nonlinear ribosome migration on cauliflower mosaic virus 35S RNA in transgenic tobacco plants. *Virology* 242, 403–413.

Schaskolskaya, N.D., Atabekov, J.G., Sacharovskaya, G.N. and Javachia, V.G. (1968). Replication of temperature-sensitive strain of tobacco mosaic virus under nonpermissive conditions in the presence of helper strain. *Biol. Sci. USSR* **8**, 101–105.

Scheets, K. (1998). Maize chlorotic mottle machlovirus and wheat streak mosaic rymovirus concentrations increase in the synergistic disease corn lethal necrosis. *Virology* **242**, 28–38.

Schenk, P.M., Sagi, L., Remans, T. *et al.* (1999). A promoter from sugarcane bacilliform badnavirus drives transgene expression in banana and other monocot and dicot plants. *Plant Mol. Biol.* **39**, 1221–1230.

Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I. *et al.* (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 11655–11660.

Schiebel, W., Haas, B., Marinkovic, S., Klanner, A. and Sänger, H. (1993). RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves: 1. Purification and physical properties. *J. Biol. Chem.* **263**, 11851–11857.

Schiebel, W., Pélissier, T., Riedel, L. *et al.* (1998). Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* **10**, 2087–2101.

Schindler, I.M. and Mühlbach, H.P (1992). Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerase in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.* **84**, 221–229.

Schirawski, J., Voyatzakis, A., Zaccomer, B., Bernardi, F. and Haenni, A.-L. (2000). Identification and functional analysis of the subgenomic promoter of turnip yellow mosaic tymovirus. *J. Virol.* **74**, *11073–11080*.

Schluckebeier, G., O'Gara, M., Saenger, W. and Cheng, X. (1995). Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferase. *J. Mol. Biol.* **247**, 16–20.

Schmelzer, K., Schmidt, H.E. and Schmidt, H.B. (1966). Viruskrankheiten und Virusverdächtige Erscheinungen an Forstgehölzen. *Arch. Forstwes.* **15**, 107–120.

Schmidt, H.E. and Zobywalski, S. (1984). Determination of pathotypes of bean yellow mosaic virus using *Phaseolus vulgaris* L. as a differential host. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* **20**, 95–96.

Schmidt, T. and Johnson, J.E. (1983). The spherically averaged structures of cowpea mosaic virus components by X-ray solution scattering. *Virology* **127**, 65–73.

Schmitz, I. and Rao, A.L.N. (1996). Molecular studies on bromovirus capsid protein: 1. Characterization of cell-to-cell movement-defective RNA3 variants of brome mosaic virus. *Virology* **226**, 281–293.

Schneider, I.R. (1964). Difference in the translocatability of tobacco ringspot and southern bean mosaic viruses in bean. *Phytopathology* **54**, 701–705.

Schneider, I.R. and Thompson, S.M. (1977). Double-stranded nucleic acids found in tissue infected with the satellite of tobacco ringspot virus. *Virology* **78**, 453–462.

Schneider, I.R. and Worley, J.F. (1959a). Upward and downward transport of infectious particles of southern bean mosaic virus through steamed portions of bean stems. *Virology* **8**, 230–242.

Schneider, I.R. and Worley, J.F. (1959b). Rapid entry of infectious particles of southern bean mosaic virus into living cells following transport of the particles in the water stream. *Virology* **8**, 243–249.

Schneider, I.R., Hull, R. and Markham, R. (1972a). Multidense satellite of tobacco ringspot virus: a regular series of components of different densities. *Virology* **47**, 320–330.

Schneider, I.R., White, R.M. and Gooding, G.V. (1972b). Two new isolates of the satellite of tobacco ringspot virus. *Virology* **50**, 902–905.

Schneider, W.L., Greene, A.E. and Allison, R.F. (1997). The carboxy-terminal two-thirds of cowpea chlorotic mottle bromovirus capsid protein is incapable of virion formation yet supports systemic movement. *J. Virol.* **71**, 4862–4865.

Schnell, R.J., Kuhn, D.N., Ronning, C.M. and Harkins, D. (1997). Application of RT-PCR for indexing avocado sunblotch viroid. *Plant Dis.* **81**, 1023–1026.

Schnölzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H. and Sänger, H.L. (1985). Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV). *EMBO J.* **4**, 2181–2190.

Schoelz, J.E. and Bourque, J.E. (1999). Plant pararetroviruses—caulimoviruses: general features. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1275–1286. Academic Press, San Diego.

Schoelz, J.E. and Shepherd, R.J. (1988). Host range control of cauliflower mosaic virus. *Virology* **162**, 30–37.

Schoelz, J.E. and Wintermantel, W.M. (1993). Expansion of viral host range through complementation and recombination in transgenic plants. *Plant Cell* **5**, 1669–1679.

Schoelz, J.E., Shepherd, R.J. and Daubert, S.D. (1986). Region VI of cauliflower mosaic virus encodes a host range determinant. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2632–3627.

Scholten, O.E. and Lange, W. (2000). Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: a review. *Euphytica* **112**, 219–231.

Scholthof, H.B. and Jackson, A.O. (1997). The enigma of pX: a host dependent *cis*-acting element with variable effects on tombusvirus RNA accumulation. *Virology* **237**, 56–65.

Scholthof, H.B., Wu, F.C., Richins, R.D. and Shepherd, R.J. (1991). A naturally occurring deletion mutant of figwort mosaic virus (caulimovirus) is generated by RNA splicing. *Virology* **184**, 290–298.

Scholthof, H.B., Gowda, S., Wu, F.C. and Shepherd, R.J. (1992a). The full-length transcript of caulimovirus is a polycistronic mRNA whose genes are transactivated by the product of gene VI. *J. Virol.* **66**, 3131–3139.

Scholthof, H.B., Wu, F.C., Gowda, S. and Shepherd, R.J. (1992b). Regulation of caulimovirus gene expression and involvement of *cis*-acting elements on both viral transcripts. *Virology* **190**, 403–412.

Scholthof, H.B., Scholthof, K.-B.G. and Jackson, A.O. (1995a). Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector. *Plant Cell* **7**, 1157–1172.

Scholthof, H.B., Scholthof, K.-B.G., Kikkert, M. and Jackson, A.O. (1995b). Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology* **213**, 425–438.

Scholthof, H.B., Scholthof, K.-B.G. and Jackson, A.O. (1996). Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**, 299–323.

Scholthof, K.-B.G. (1999). A synergism induced by satellite panicum mosaic virus. *Mol. Plant. Microb. Interact.* **12**, 163–166.

Scholthof, K.-B.G., Scholthof, H.B. and Jackson, A.O. (1993). Control of plant diseases by pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Plant Physiol.* **102**, 7–12.

Scholthof, K.-B.G., Hillman, B.I., Modrell, B., Heaton, L.A. and Jackson, A.O. (1994). Characterization and detection of sc4—a 6th gene encoded by Sonchus yellow net virus. *Virology* **204**, 279–288.

Scholthof, K.-B.G., Scholthof, H.B and Jackson, A.O. (1995c). The tomato bushy stunt virus replicase proteins are coordinately expressed and membrane associated, *Virology* **208**, 265–269.

Scholthof, K.-B., G., Shaw, J.G. and Zaitlin, M. (eds) (1999a). *Tobacco Mosaic Virus: One Hundred Years of Contributions to Virology.* American Phytopathology Society Press, St Paul, MN.

Scholthof, K.-B.G., Jones, R.W. and Jackson, A.O. (1999b). Biology and structure of plant satellite viruses activated by icosahedral helper viruses. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **239**, 123–143.

Schonborn, J., Oberstrass, J., Breyel, E., Tittgen, J., Schumacher, J. and Lukacs, N. (1991). Monoclonal antibodies to double-stranded RNA as probes of RNA structure in crude nucleic acid extracts. *Nucl. Acids Res.* **19**, 2993–3000.

Schroeder, T.A. (2001). Microtubules don and doff their caps: dynamic attachments at the plus and minus ends. *Curr. Opin Cell Biol.* **13**, 92–96.

Schroeder, W.T. and Provvidenti, R. (1968). Resistance of bean (*Phaseolus vulgaris*) to the PV2 strain of bean yellow mosaic virus conditioned by the single dominant gene *By*. *Phytopathology* **58**, 1710.

Schroeder, W.T. and Provvidenti, R. (1971). A common gene for resistance to bean yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 in *Pisum sativum*. *Phytopathology* **61**, 846–848.

Schuchalter-Eicke, G. and Jeske, H. (1983). Seasonal changes in the chloroplast ultrastructure in *Abutilon* mosaic virus (ABMV) infected *Abutilon* spec. (Malvaceae). *Phytopathol. Z.* **108**, 172–184.

Schultze, M., Jiricny, J. and Hohn, T. (1990). Open reading frame VIII is not required for viability of cauliflower mosaic virus. *Virology* **176**, 662–664.

Schumacher, J., Meyer, N., Riesner, D. and Weidemann, H.L. (1986). Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by 'return'-gel electrophoresis. *J. Phytopathol.* **115**, 332–343.

Schuman, S. and Schwer, B. (1995). RNA capping enzymes and DNA ligases, a superfamily of covalent nucleotidyl transferases. *Mol. Microbiol.* **17**, 405–410.

Schuster, P. and Stadler, P.F. (1999). Nature and evolution of early replicons. In: E. Domingo, R. Webster and J. Holland (eds) *Origin and evolution of viruses*, pp. 1–24. Academic Press, London.

Scott, S.W., Zimmerman, M.T. and Ge, X. (1998). The sequence of RNA 1 and RNA 2 of tobacco streak virus: additional evidence for the inclusion of alfalfa mosaic virus in the genus Ilarvirus. *Archiv. Virol.* **143**, 1187–1198.

Scotti, P.D. (1985). The estimation of virus density in isopycnic cesium chloride gradients. *J. Virol. Methods* **12**, 149–160.

Sdoodee, R. and Teakle, D.S. (1993). Studies on the mechanism of transmission of pollen-associated tobacco streak ilarvirus by *Thrips tabaci*. *Plant Pathol.* **42**, 88–92.

Seddas, A., Haidar, M.M., Greif, C., Jacquet, C., Cloquemin, G. and Walter, B. (2000). Establishment of a relationship between grapevine leafroll closteroviruses 1 and 3 by use of monoclonal antibodies. *Plant Pathol.* **49**, 80–85.

Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A. and Göschl, M. (1998), Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* **80**, 3–27.

Sehgal, O.P. (1999). Sobemoviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1674–1680. Academic Press, San Diego.

Sehgal, O.P. and Hsu, C.H. (1977). Identity and location of a minor protein component in virions of southern bean mosaic virus. *Virology* **77**, 1–11.

Sela, I., Reichman, M. and Weissbach, A. (1984). Comparison of dot molecular hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay for detecting tobacco mosaic virus in plant tissues and protoplasts. *Phytopathology* **74**, 385–389.

Sela, I., Grafi, G., Sher, N., Edelbaum, O., Yagev, H., and Gerassi, E. (1987). Resistance systems related to the N gene and their comparison with interferon. In: D. Evered and S. Hamell, (eds) *Plant Resistance to Viruses*, pp. 109–119. Wiley, Chichester.

Selling, B.H., Allison, R.F. and Kaesberg, P. (1990). Genomic RNA of an insect virus directs synthesis of infectious virions in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 434–438.

Selman, B.J. (1973). Beetles—phytophagous Coleoptera. In: A.J. Gibbs (ed.) *Viruses and Invertebrates*, pp. 157–177. North-Holland, Amsterdam.

Selsky, M.I. and Black, L.M. (1962). Effect of high and low temperatures on the survival of wound-tumor virus in sweet clover. *Virology* **16**, 190–198.

Selstam, E. and Jackson, A.O. (1983). Lipid composition of sonchus yellow net virus. *J. Gen. Virol.* **64**, 1607–1613.

Semal, J. and Kummert, J. (1969). Effects of actinomycin D on the incorporation of uridine into virus-infected leaf fragments. *Phytopathol. Z.* **65**, 364–372.

Semancik, J.S. and Duran-Vila, N. (1999). Viroids in plants: shadows and footprints of a primitive RNA. In: E. Domingo, R. Webster and J. Holland (eds) *Origin and evolution of viruses*, pp. 37–64. Academic Press, London.

Semancik, J.S. and Vanderwoude, W.J. (1976). Exocortis viroid: cytopathic effects at the plasma membrane in association with pathogenic RNA. *Virology* **69**, 719–726.

Semancik, J.S., Szychowski, J.A., Rakowski, A.C. and Symons, R.H. (1994). A stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. *J. Gen. Virol.* **75**, 727–732.

Semancik, J.S., Rakowski, A.G., Bash, J.A. and Gumpf, D.J. (1997). Application of selected viroids for dwarfing and enhancement of production of 'Valencia' orange. *J. Hort. Sci.* **72**, 563–570.

Senke, P.C. and Johnson, J.E. (1993). Crystallization and preliminary X-ray characterization of tobacco streak virus and a proteolytically modified form of the capsid protein. *Virology* **196**, 328–331.

Seppänen, P., Puska, R., Honkanen, J. *et al.* (1997). Movement protein-derived resistance to triple gene block-containing plant viruses. *J. Gen. Virol.* **78**, 1241–1246.

Séron, K. and Haenni, A.-L. (1996). Vascular movement of plant viruses. *Mol. Plant-Microb. Interact.* **6**, 435–442.

Serwer, P. (1977). Flattening and shrinkage of bacteriophage T7 after preparation for electron microscopy by negative staining. *J. Ultrastruct. Res.* **58**, 235–243.

Sether, D.M., Ullman, D.E. and Hu, J.S. (1998) Transmission of pineapple mealybug wilt-associated virus by two species of mealybug (*Dysmicoccus* spp.). *Phytopathology* **88**, 1224–1230.

Shah, J., Kachroo, P. and Klessig, D.F. (1999). The *Arabidopsis ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* **11**, 191–206.

Shalla, T.A., Shepherd, R.J. and Petersen, L.J. (1980). Comparative cytology of nine isolates of cauliflower mosaic virus. *Virology* **102**, 381–388.

Shalla, T.A., Petersen, L.-J. and Zaitlin, M. (1982). Restricted movement of a temperature-sensitive virus in tobacco leaves is associated with a reduction in numbers of plasmodesmata. *J. Gen. Virol.* **60**, 355–358.

Shanks, M. and Lomonossoff, G.P. (2000). Co-expression of the capsid proteins of cowpea mosaic virus in insect cells leads to the formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **81**, 3093–3097.

Shanks, M., Lomonossoff, G.P. and Evans, D. (1985). Double-stranded, replicative form RNA molecules of cowpea mosaic virus are not infectious. *J. Gen. Virol.* **66**, 925–930.

Shanks, M., Maule, A.J., Wilson, I.G., Lomonossoff, G.P., Huskison, N. and Tomenius, K. (1988). RCMV gene expression. *Annu. Rep. John Innes Inst.* **73**.

Shanks, M., Tomenius, K., Chapham, D. *et al.* (1989). Identification and subcellular localization of a putative cell-to-cell transport protein from red clover mottle virus. *Virology* **173**, 400–407.

Sharp, P. (2000). RNAi and double-stranded RNA. *Genes Devel.* **13**, 139–141.

Sharp, P.A. and Zamore, P.D. (2000). RNA interference. *Science* **287**, 2431–2433.

Shaw, J.G. (1969). *In vivo* removal of protein from tobacco mosaic virus after inoculation of tobacco leaves: II. Some characteristics of the reaction. *Virology* **37**, 109–116.

Shaw, J.G. (1973). *In vivo* removal of protein from tobacco mosaic virus after inoculation of tobacco leaves: III. Studies on the location on virus particles for the initial removal of protein. *Virology* **53**, 337–342.

Shaw, J.G. (1999). Tobacco mosaic virus and the study of early events in virus infection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **354**, 603–611.

Shaw, J.G., Plaskitt, K.A. and Wilson, T.M.A. (1986). Evidence that tobacco mosaic virus particles disassemble cotranslationally *in vivo*. *Virology* **148**, 326–336.

Shaw, J.G., Hunt, A.G., Pirone, T.P. and Rhodes, R.E. (1990). Organisation and expression of potyviral genes. In: T.P. Pirone and J.G. Shaw (eds) *Viral Genes and Plant Pathogens*, pp. 107–123. Springer-Verlag, New York.

Sheldon, C.C., Jeffries, A.C., Davies, C. and Symons, R.H. (1990). RNA self-cleavage by the hammerhead structure. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **4**, 227–242.

Shen W.-H. and Hohn, B. (1994). Amplification and expression of the —glucuronidase gene in maize by vectors based on maize streak virus. *Plant J.* **5**, 227–236.

Shen, P., Kaniewski, M.B., Smith, C. and Beachy, R.N. (1993). Nucleotide sequence and genomic organization of rice tungro spherical virus. *Virology* **193**, 621–630.

Shenk, P.M., Sagi, L., Remans, T. *et al.* (1999). A promoter from sugarcane bacilliform badnavirus drives transgene expression in banana and other monocot and dicot plants. *Plant Mol. Biol.* **39**, 1221–1230.

Shepard, J.F. (1975). Regeneration of plants from protoplasts of potato virus X-infected tobacco leaves. *Virology* **66**, 492–501.

Shepard, J.F. (1981). Protoplasts as sources of disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **19**, 145–166.

Shepard, J.F. and Uyemoto, J.K. (1976). Influence of elevated temperatures on the isolation and proliferation of mesophyll protoplasts from PVX- and PVY-infected tobacco tissue. *Virology* **70**, 558–560.

Shepardson, S., Esau, K. and McCrum, R. (1980). Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *Virology* **105**, 379–392.

Shepherd, R.J. (1972). Transmission of viruses through seed and pollen. In: C.I. Kado and H.O. Agrawal (eds) *Principles and Techniques in Plant Virology*, pp. 267–292. Van Nostrand-Reinhold, Princeton, NJ.

Shepherd, R.J. (1976). DNA viruses of higher plants. *Adv. Virus Res.* **20**, 305–339.

Shepherd, R.J. and Hills, F.J. (1970). Dispersal of beet yellows and beet mosaic viruses in the inland valleys of California. *Phytopathology* **60**, 798–804.

Shepherd, R.J., Wakeman, R.J. and Romanko, R.R. (1968). DNA in cauliflower mosaic virus. *Virology* **36**, 150–152.

Shepherd, R.J., Bruening, G.E. and Wakeman, R.J. (1970). Double-stranded DNA from cauliflower mosaic virus. *Virology* **41**, 339–347.

Sherwood, J.L. and Fulton, R.W. (1982). The specific involvement of coat protein in tobacco mosaic virus cross protection. *Virology* **119**, 150–158.

Sherwood, J.L., Sanborn, M.R., Keyser, G.C. and Meyers, L.D. (1989). Use of monoclonal antibodies in detection of tomato spotted wilt virus. *Phytopathology* **79**, 61–64.

Shewmaker, C.K., Caton, J.R., Houck, C.M. and Gardner, R.C. (1985). Transcription of cauliflower mosaic virus integrated into plant genomes. *Virology* **140**, 281–288.

Shewry, P.R. and Lucas, J.A. (1997). Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. *Adv. Bot. Res.* **26**, 135–192.

Shields, S.A. and Wilson, T.M.A. (1987). Cell-free translation of turnip mosaic virus RNA. *J. Gen. Virol.* **68**, 169–180.

Shields, S.A., Brisco, M.J., Wilson, T.M.A. and Hull, R. (1989). Southern bean mosaic virus RNA remains associated with swollen virions during translation in wheat germ cell-free extracts. *Virology* **171**, 602–606.

Shih, D.-S. and Kaesberg, P. (1973). Translation of brome mosaic viral ribonucleic acid in a cell-free system derived from wheat embryo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **70**, 1799–1803.

Shih, D.-S. and Kaesberg, P. (1976). Translation of the RNAs of brome mosaic virus: the monocistronic nature of RNA1 and RNA2. *J. Mol. Biol.* **103**, 77–88.

Shikata, E. and Maramorosch, K. (1966). Electron microscopy of pea enation mosaic virus in plant cell nuclei. *Virology* **30**, 439–454.

Shikata, E. and Maramorosch, K. (1967). Electron microscopy of wound tumor virus assembly sites in insect vectors and plants. *Virology* **32**, 363–377.

Shintaku, M. and Palukaitis, P. (1990). Genetic mapping of cucumber mosaic virus. In: T.P. Pirone and J.G. Shaw (eds) *Viral Genes and Plant Pathogenesis*, pp. 156–164. Springer, New York.

Shintaku, M.H., Zhang, L. and Palukaitis, P. (1992). A single amino acid substitution in the coat protein of cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. *Plant Cell* **4**, 751–757.

Shintaku, M.H., Carter, S.A., Bao, Y.M. and Nelson, R.S. (1996). Mapping nucleotides in the 126-kDa protein gene that control the differential symptoms induced by two strains of tobacco mosaic virus. *Virology* **221**, 218–225.

Shirako, Y. (1998). Non-AUG translation initiation in a plant RNA virus: a forty-amino-acid extension is added to the N terminus of the soil-borne wheat mosaic virus capsid protein. *J. Virol.* **72**, 1677–1682.

Shirako, Y. and Ehara, Y. (1986). Comparison of the *in vitro* translation products of wild-type and deletion mutant of soil-borne wheat mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 1237–1245.

Shirako, Y. and Ehara, Y. (1990). Comparison of the *in vitro* translation products of wild-type and deletion mutant of soil-borne wheat mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 1237–1245.

Shirako, Y. and Wilson, T.M.A. (1993). Complete nucleotide sequence and organization of the bipartite RNA genome of soil-borne wheat mosaic virus. *Virology* **195**, 16–32.

Shirako, Y. and Wilson, T.M.A. (1999). Furoviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 587–596. Academic Press, San Diego.

Shukla, D.D. and Schmelzer, K. (1973). Studies on viruses and virus disease of cruciferous plants. XIV. Cucumber mosaic virus in ornamental and wild species. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **8**, 149–155.

Shukla, D.D. and Schmelzer, K. (1975). Studies on viruses and virus diseases of cruciferous plants. XIX. Analysis of the results obtained with ornamental and wild species. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **10**, 217–229.

Shukla, D.D. and Ward, C.W. (1988). Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *J. Gen. Virol.* **69**, 2703–2710.

Shukla, D.D. and Ward, C.W. (1989a). Structure of potyvirus and coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Adv. Virus Res.* **36**, 273–314.

Shukla, D.D. and Ward, C.W. (1989b). Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Arch. Virol.* **106**, 171–200.

Shukla, D.D., O'Donnell, I.J. and Gough, K.H. (1983). Characteristics of the electro-blot radioimmunoassay (EBRIA) in relation to the identification of plant viruses. *Acta Phytopathol. Acad. Sci.* **18**, 79–84.

Shukla, D.D., McKern, N.M., Gough, K.H., Tracey, S.L. and Letho, S.G. (1988a). Differentiation of potyviruses and their strains by high performance liquid chromatographic peptide profiling of coat proteins. *J. Gen. Virol.* **69**, 493–502.

Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H. and Ward, C.W. (1988b). The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *J. Gen. Virol.* **69**, 1497–1508.

Shukla, D.D., Jilka, J., Tosic, M. and Ford, R.E. (1989a). A novel approach to the serology of potyviruses involving affinity-purified polygonal antibodies directed towards virus specific N-termini of coat proteins. *J. Gen. Virol.* **70**, 13–23.

Shukla, D.D., Tosic, M., Jilka, J., Ford, R.E., Toler, R.W. and Langham, M.A.C. (1989b). Taxonomy of potyviruses infecting maize, sorghum and sugarcane in Australia and the United States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. *Phytopathology* **79**, 223–229.

Shukla, D.D., Tribbick, G., Mason, T.-J., Hewish, D.R., Geysen, H.M. and Ward, C.W. (1989c). Localization of virus-specific and group-specific epitopes of plant potyviruses by systematic immunochemical analysis of overlapping peptide fragments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 8192–8196.

Shukla, D.D., Ford, R.E., Tosic, M., Jilka, J. and Ward, C.W. (1989d). Possible members of the potyvirus group transmitted by mites or whiteflies share epitopes with aphid-transmitted definitive members of the group. *Arch. Virol.* **105**, 143–151.

Shukla, D.D., Ward, C.W. and Brunt, A.A. (1994). *The Potyviridae*. CAB International, Wallingford, UK.

Shukla, V.D. and Anjaneyulu, A. (1981). Plant spacing to reduce rice tungro incidence. *Plant Dis.* **65**, 584–586.

Shukla, V.D. and Anjaneyulu, A. (1982). Evaluation of systemic insecticides to reduce tungro disease incidence in rice nursery. *Indian Phytopathol.* **35**, 502–504.

Shukle, R.H., Lampe, D.J., Lister, R.M. and Foster, J.E. (1987). Aphid feeding behaviour: relationship to barley yellow drawf virus resistance in *Agropyron* species. *Phytopathology* **77**, 725–729.

Sidwell, R.W., Huffman, J.H., Khare, G.P., Allen, L.B., Witkowski, J.T. and Robins, R.K. (1972). Broad-spectrum antiviral activity of virazole: 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* **177**, 705–706.

Siegel, A. (1960). Studies on the induction of tobacco mosaic virus mutants with nitrous acid. *Virology* **11**, 156–167.

Siegel, A. (1971). Pseudovirions of tobacco mosaic virus. *Virology* **46**, 50–59.

Siegel, A. (1985). Plant-virus-based vectors for gene transfer may be of considerable use despite a presumed high error frequency during RNA synthesis. *Plant Mol. Biol.* **4**, 327–329.

Siegel, A., Zaitlin, M. and Sehgal, O.P. (1962). The isolation of defective tobacco mosaic virus strains. *Proc. Natl Acad. Sci.* **48**, 1845–1851.

Siegel, A., Hari, V. and Kolacz, K. (1978). The effect of tobacco mosaic virus infection on host and virus-specific protein synthesis in protoplasts. *Virology* **85**, 494–503.

Siegel, R.W., Adkins, S. and Kao, C.C. (1997). Sequence-specific recognition of a subgenomic RNA promoter by a viral RNA polymerase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 11238–11243.

Siegel, R.W., Bellon, L., Beigelman, L. and Kao, C.C. (1998). Moieties in an RNA promoter specifically recognized by a viral RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 11613–11618.

Siitari, H. and Kurppa, A. (1987). Time resolved fluoroimmunoassay in the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **68**, 1423–1428.

Sijen, T., Wellink, J., Hendriks, J., Verver, J. and van Kammen, A. (1995). Replication of cowpea mosaic virus RNA1 and RNA2 is specifically blocked in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing the full-length replicase or movement protein genes. *Mol. Plant Microb. Interact.* **8**, 340–347.

Sijen, T., Wellink, J., Hiriart, J.-B. and van Kammen, A. (1996). RNA-mediated virus resistance: role of repeated transgenes and delineation of targeted regions. *Plant Cell* **8**, 2277–2294.

Silber, G. and Burk, L.G. (1965). Infectivity of tobacco mosaic virus stored for fifty years in extracted 'unpreserved' plant juice. *Nature (London)* **206**, 740–741.

Sill, W.H. and Walker, J.C. (1952). A virus inhibitor in cucumber in relation to mosaic resistance. *Phytopathology* **42**, 349–352.

Silva, A.M. and Rossmann, M.G. (1987). Refined structure of southern bean mosaic virus at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **197**, 69–87.

Silva, J.L. and Weber, G. (1988). Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **199**, 149–159.

Simon, A.E. (1999). Replication, recombination and symptom-modulation properties of the satellite RNAs of turnip crinkle virus. In: P.K. Vogt and A.O. Jackson (eds) *Satellites and Defective Viral RNAs*, pp. 19–36. Springer, Berlin.

Simon, A.E. and Howell, S. (1986). The virulent satellite RNA of turnip crinkle virus has a major domain homologous to the 3′ end of the helper virus genome. *EMBO J.* **5**, 3423–3428.

Simon, A.E. and Howell, S. (1987). Synthesis *in vitro* of infectious RNA copies of the virulent satellite of turnip crinkle virus. *Virology* **156**, 146–152.

Simon, A.E. and Nagy, P.D. (1996). RNA recombination in turnip crinkle virus: its role in formation of chimeric RNAs, multimers, and in 3′-end repair. *Sem. Virol.* **7**, 373–379.

Simon, A.E. and Zhang, G. (2001). The modular nature of viral replicase enhancers. Abstract W16-1, 20th Annual Meeting of the American Society for Virology.

Simon, A.E., Engel, H., Johnson, R.P. and Howell, S.H. (1988). Identification of regions affecting virulence, RNA processing and infectivity in the virulent satellite of turnip crinkle virus. *EMBO J.* **7**, 2645–2651.

Simon, A.E., Li, X.H., Lew, J.E., Strange, R., Zhang, C., Polacco, M. and Carpenter, C.D. (1992). Susceptibility and resistance of *Arabidopsis thaliana* to turnip crinkle virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**, 496–503.

Simpkins, I., Walkey, D.G.A. and Neely, H.A. (1981). Chemical suppression of virus in cultured plant tissues. *Ann. Appl. Biol.* **99**, 161–169.

Singh, M.N., Khurana, S.M.P., Nagaich, B.B. and Agrawal, H.O. (1988a). Environmental factors influencing aphid transmission of potato virus Y and potato leafroll virus. *Potato Res.* **31**, 501–509.

Singh, R.N. and Dreher, T.W. (1997). Turnip yellow mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase initiation of minus strand synthesis *in vitro*. *Virology* **233**, 430–439.

Singh, R.P. (1984). *Solanum X berthaultii*, a sensitive host for indexing potato spindle tuber viroid from dormant tubers. *Potato Res.* **27**, 163–172.

Singh, R.P. and Kurz, J. (1997). RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Can. J. Plant Pathol.* **19**, 418–424.

Singh, R.P. and Slack, S.A. (1984). Reactions of tuber-bearing *Solanum* species to infection with potato spindle tuber viroid. *Plant Dis.* **68**, 784–787.

Singh, R.P. and Somerville, T.H. (1987). New disease symptoms observed on field-grown potato plants with potato spindle tuber viroid and potato virus Y infections. *Potato Res.* **30**, 127–132.

Singh, R.P., Lee, C.R. and Clark, M.C. (1974). Manganese effect on the local lesion symptom of potato spindle tuber 'virus' in *Scopolia sinensis*. *Phytopathology* **64**, 1015–1018.

Singh, R.P., Boucher, A. and Seabrook, J.E.A. (1988b). Detection of the mild strains of potato spindle tuber viroid from single true potato seed by return electrophoresis. *Phytopathology* **78**, 663–667.

Singh, S.K., Anjaneyula, A. and Lapierre, H. (1984). Use of pectino-cellulolytic enzymes for improving extraction of phloem-limited plant viruses as exemplified by the rice tungro virus complex. *Agronomie* **4**, 479–484.

Sinha, R.C. (1967). Response of wound tumor virus infection in insects to vector age and temperature. *Virology* **31**, 746–748.

Sinijärv, R., Järvekülg, L. andreeva, E. and Saarma, M. (1988). Detection of potato virus X by one incubation europium time-resolved fluoroimmunoassay and ELISA. *J. Gen. Virol.* **69**, 991–998.

Sinisterra, X.H., Polston, J.E., Abouzid, A.M. and Hiebert, E. (1999). Tobacco plants transformed with a modified coat protein of tomato mottle begomovirus show resistance to virus infection. *Phytopathology* **89**, 701–706.

Sisler, W.W. and Timian, R.G. (1956) Inheritance of barley stripe mosaic virus resistance of Modjo (C.I. 3212) and C.I. 3212-1. *Plant Dis. Rep.* **40**, 1106–1108.

Sit, T.L., Leclerc, D. and AbouHaidar, M.G. (1994). The minimal 5′ sequence for *in vitro* initiation of papaya mosaic potexvirus assembly. *Virology* **199**, 238–242.

Sit, T.L., Vaewhongs, A.A. and Lommel, S.A. (1998). RNA-mediated trans-activation of transcription from a viral RNA. *Science* **281**, 829–832.

Siuzdak, G. (1998). Probing viruses with mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **33**, 203–211.

Sivakumaran, K. and Hacker, D.L. (1998). The 105-kDa polyprotein of southern bean mosaic virus is translated by scanning ribosomes. *Virology* **246**, 34–44.

Sivakumaran, K. and Kao, C.C. (1999). Initiation of genomic plus-strand RNA synthesis from DNA and RNA templates by a viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **73**, 6415–6423.

Sivakumaran, K., Fowler, B.C. and Hacker, D.L. (1998). Identification of viral genes required for cell-to-cell movement of southern bean mosaic virus. *Virology* **252**, 376–386.

Sivakumaran, K., Kim, C.-H., Tayon, R. and Kao, C.C. (1999). RNA sequence and secondary structural determinants in a minimal viral promoter that directs replicase recognition and initiation of genomic plus-strand synthesis. *J. Mol. Biol.* **294**, 667–682.

Sivakumaran, K., Bao, Y., Roossinck, M.J. and Kao, C.C. (2000). Recognition of the core RNA promoter for minus-strand RNA synthesis by the replicase of brome mosaic virus and cucumber mosaic virus. *J. Virol.* **74**, 10323–10331.

Skaf, J.S., Schultz, M.H., Hirata, H. and de Zoeten, G.A. (2000). Mutational evidence that the VPg is involved in the replication but not the movement of pea enation mosaic virus-1. *J. Gen. Virol.* **81**, 1103–1109.

Skaria, M., Lister, R.M. and Foster, J.E. (1984). Lack of barley yellow dwarf virus dosage effects on virus content in cereals. *Plant. Dis.* **68**, 759–761.

Skotnicki, A., Gibbs, A. and Wrigley, N.G. (1976). Further studies on *Chara corallina* virus. *Virology* **75**, 457–468.

Skulachev, M.V., Ivanov, P.A., Karpova, O.V. *et al.* (1999). Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the tobamovirus subgenomic RNA I_2. *Virology* **263**, 139–154.

Skuzeski, J.M., Nichols, L.M., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. (1991). The signal for a leaky UAG stop codon in several plant viruses includes the two downstream codons. *J. Mol. Biol.* **218**, 365–373.

Slack, C.R. (1969). Localization of certain photosynthetic enzymes in mesophyll and parenchyma sheath chloroplasts of maize and *Amaranthus palmeri*. *Photochemistry* **8**, 1387–1391.

Slack, S.A. and Singh, R.P. (1998). Control of viruses affecting potatoes through seed potato certification programs. Breeding for resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 249–260. APS Press, St. Paul, MN.

Sleat, D.E. and Palukaitis, P. (1990a). Site-directed mutagenesis of a plant viral satellite RNA changes its phenotype from ameliorative to necrogenic. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 2946–2950.

Sleat, D.E. and Palukaitis, P. (1990b). Induction of tobacco chlorosis by cucumber mosaic virus satellite RNAs is specific to subgroup II helper strains. *Virology* **176**, 292–295.

Sleat, D.E., Turner, P.C., Finch, J.T., Butler, P.J.G. and Wilson, T.M.A. (1986). Packaging of recombinant RNA molecules into pseudovirus particles directed by the origin-of-assembly sequences from tobacco mosaic virus RNA. *Virology* **155**, 299–308.

Sleat, D.E., Gallie, D.R., Jefferson, R.A., Bevan, M.W., Turner, P.C. and Wilson, T.M.A. (1987). Characterisation of the 5' leader sequence of tobacco mosaic virus RNA as a general enhancer of translation *in vitro*. *Gene* **60**, 217–225.

Sleat, D.E., Hull, R., Turner, P.C. and Wilson, T.M.A. (1988a). Studies on the mechanism of translational enhancement by the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Eur. J. Biochem.* **175**, 75–86.

Sleat, D.E., Plaskitt, K.A. and Wilson, T.M.A. (1988b). Selective encapsulation of CAT gene transcripts in TMV-infected transgenic tobacco inhibits CAT synthesis. *Virology* **165**, 609–612.

Sleat, D.E., Gallie, D.R., Watts, J.W. *et al.* (1988c). Selective recovery of foreign gene transcripts as virus-like particles in TMV-infected transgenic tobaccos. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3127–3140.

Slykhuis, J.T. (1955). *Aceria tulipae* Keifer (Acarina: Eriophyidae) in relation to the spread of wheat streak mosaic. *Phytopathology* **45**, 116–128.

Slykhuis, J.T. (1962). Mite transmission of plant viruses. In: K. Maramorosch (ed.) *Biological Transmission of Disease Agents*, pp. 41–61. Academic Press, New York.

Slykhuis, J.T. (1963). Vector and host relations of North American wheat striate mosaic virus. *Can. J. Bot.* **41**, 1171–1185.

Slykhuis, J.T. (1965). Mite transmission of plant viruses. *Adv. Virus Res.* **11**, 97–137.

Slykhuis, J.T. (1970). Factors determining the development of wheat spindle streak mosaic caused by a soil-borne virus in Ontario. *Phytopathology* **60**, 319–331.

Slykhuis, J.T. (1974). Differentiation of transmission and incubation temperatures for wheat spindle streak mosaic virus. *Phytopathology* **64**, 554–557.

Slykhuis, J.T. (1976). Stimulating effects of transplanting on the development of wheat spindle streak mosaic virus in wheat plants infected from soil. *Phytopathology* **66**, 130–131.

Slykhuis, J.T., Andrews, J.E. and Pittmann, U.J. (1957). Relation of date of seeding winter wheat in southern Alberta to losses from wheat streak mosaic, root rot and rust. *Can. J. Plant Sci.* **37**, 113–127.

Smardon, A., Spoerke, J.M., Stacey, S.C., Klein, M.E., Mackin, N. and Maine, E.M. (2000). EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germline development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **10**, 169–178.

Smidansky, E.D. and Carroll, T.W. (1996). Factors influencing the outcome of barley yellow streak mosaic virus-brown wheat mite-barley interactions. *Plant Dis.* **80**, 186–193.

Smirnyagina, E., Hsu, Y.-H., Chua, N. and Ahlquist, P. (1994). Second-site mutations in the brome mosaic virus RNA3 intercistronic region partially suppress a defect in coat protein mRNA transcription. *Virology* **198**, 427–436.

Smit, C.H., Roosien, J., van Vloten-Doting, L. and Jaspars, E.M.J. (1981). Evidence that alfalfa mosaic virus infection starts with three RNA–protein complexes. *Virology* **112**, 169–173.

Smith, C.R., Tousignant, M.E., Geletka, L.M. and Kaper, J.M. (1992). Competition between cucumber mosaic virus satellite RNAs in tomato seedlings and protoplasts: a model for satellite-mediated control of tomato necrosis. *Plant Dis.* **76**, 1270–1274.

Smith, D.B. and Inglis, S.C. (1987). The mutation rate and variability of eukaryotic viruses: an analytical review. *J. Gen. Virol.* **68**, 2729–2740.

Smith, D.B., McAllister, J., Casino, C. and Simmonds, P. (1997). Virus 'quasispecies': making a mountain out of a molehill? *J. Gen. Virol.* **78**, 1511–1519.

Smith, F.D. and Banttari, E.E. (1987). Dot-ELISA on nitrocellulose membranes for detection of potato leafroll virus. *Plant. Dis.* **71**, 795–799.

Smith, G.E., Vlak, J.M and Summers, M.D. (1983). Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10,000-molecular-weight protein. *J. Virol.* **45**, 215–225.

Smith, G.R., Borg, Z., Lockhart, B.E., Braithwaite, K.S. and Gibbs, M.J. (2000a). Sugarcane yellow leaf virus: a novel member of the *Luteoviridae* that probably arose by inter-species recombination. *J. Gen. Virol.* **81**, 1865–1869.

Smith, H.A., Swaney, S.L., Parks, T.D., Wernsman, E.A. and Dougherty, W.G. (1994). Transgenic plant resistance mediated by untranslatable RNAs: expression, regulation and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* **6**, 1441–1453.

Smith, H.C. (1967). The effect of aphid numbers and stage of plant growth in determining tolerance to barley yellow dwarf virus in cereals. *N. Z. J. Agric. Res.* **10**, 445–466.

Smith, H.G. (1986). Fodder beet clamps as a source of virus yellows. *British Sugar Beet Rev.* **54**, 38–39.

Smith, H.G. and Barker, H. (eds) (1999). The *Luteoviridae*. CAB International, Wallingford, UK.

Smith, K.M. (1931). On the composite nature of certain potato virus diseases of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators and selective methods of transmission. *Proc. R. Soc. London B* **109**, 251–266.

Smith, K.M. (1937). *A Text Book of Plant Virus Diseases*. Churchill, London.

Smith, K.M. (1972). *A Textbook of Plant Virus Diseases*, 3rd edn. Longmans Green, New York.

Smith, M.C., Holt, J., Kenyon, L. and Foot, C. (1998). Quantitative epidemiology of banana bunchy top virus disease and its control. *Plant Pathol.* **47**, 177–187.

Smith, M.D. (1996). Antibody production in plants. *Biotechnol. Adv.* **14**, 267–281.

Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.-B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G. and Waterhouse, P.M. (2000b). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**, 319–320.

Smith, P.R. (1983). The Australian Fruit Variety Foundation and its role in supplying virus-tested planting material to the fruit industry. *Acta Hortic.* **130**, 263–266.

Smith, S.H. and Schlegel, D.E. (1964). The distribution of clover yellow mosaic virus in *Vicia faba* root tips. *Phytopathology* **54**, 1273–1274.

Smith, S.H. and Schlegel, D.E. (1965). The incorporation of nucleic acid precursors in healthy and virus-infected plant. *Virology* **26**, 180–189.

Smith, S.S. and Murakishi, H.M. (1993). Restricted virus multiplication and movement of tomato mosaic virus in resistant tomato somaclones. *Plant Sci.* **89**, 113–122.

Smith, T.A. (1985). Polyamines. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 117–143.

Smith, T.A. (1987). The isolation of the two electrophoretic forms of cowpea mosaic virus using fast protein liquid chromatography. *J. Virol. Meth.* **16**, 263–269.

Sneath, P.H.A. (1962). The construction of taxonomic groups. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **12**, 289–332.

Sõber, J., Järvekülg, L., Toots, I., Radavsky, J., Villems, R. and Saarma, M. (1988). Antigenic characterisation of potato virus X with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **69**, 1799–1807.

Soellick, T.-R., Uhrig, J.F., Butcher, G.L., Kellmann, J.-W. and Schreier, P.H. (2000). The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 2373–2378.

Sohal, A.K., Love, A.J., Cecchini, E., Covey, S.N., Jenkins, G.I. and Milner, J.J. (1999). Cauliflower mosaic virus infection stimulates lipid transfer protein gene expression in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **50**, 1727–1733.

Sokmen, M.A., Barker, H. and Torrance, L. (1998). Factors affecting the detection of potato mop-top virus in potato tubers and improvement of test procedures for more reliable assays. *Ann. Appl. Biol.* **133**, 55–63.

Sol, H.H. (1963). Some data on the occurrence of rattle virus at various depths in the soil and on its transmission. *Tijdschr. Plantenziekten* **69**, 208–214.

Solis, I. and García-Arenal, F. (1990). The complete nucleotide sequence of the genomic RNA of the tobamovirus tobacco mild green mosaic virus. *Virology* **177**, 553–558.

Solovyev, A.G., Savenkov, E.I., Agranovsky, A.A. and Morozov, S.Y. (1996). Comparisons of the genomic *cis*-elements and coding regions in RNA components of the hordeiviruses barley stripe mosaic virus, lychnis ringspot virus, and poa semilatent virus. *Virology* **219**, 9–18.

Song, S.-K., Choi, Y., Moon, Y.H., Kim, S.-G., Choi, Y.D. and Lee, J.S. (2000). Systemic induction of a *Phytolacca insularis* antiviral protein gene by mechanical wounding, jasmonic acid, and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* **43**, 439–450.

Sonoda, S., Mori, M. and Nishiguchi, M. (1999). Homology-dependent virus resistance in transgenic plants with the coat protein gene of sweet potato feathery mottle potyvirus: target specificity and transgene methylation. *Phytopathology* **89**, 385–391.

Sorger, P.K., Stockley, P.G. and Harrison, S.C. (1986). Structure and assembly of turnip crinkle virus: II. Mechanism of reassembly *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **191**, 639–658.

Soto, P.E., Buddenhagen, I.W. and Asnani, V.L. (1982). Development of streak virus-resistant maize populations through improved challenge and selection methods. *Ann. Appl. Biol.* **100**, 539–546.

Spall, V.E., Shanks, M. and Lomonossoff, G.P. (1997). Polyprotein processing as a strategy for gene expression in RNA viruses. *Sem. Virol.* **8**, 15–23.

Speir, J.A., Munshi, S., Baker, T.S. and Johnson, J.E. (1993). Preliminary X-ray analysis of crystalline cowpea chlorotic mottle virus. *Virology* **193**, 234–241.

Speir, J.A., Munshi, S., Wang, G., Baker, T.S. and Johnson, J.E. (1995). Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure* **3**, 63–78.

Spirin, A.S. (1961). The 'temperature effect' and macromolecular species of high polymer ribonucleic acids of various origins. *Biokhimiya* **26**, 454–463.

Sprague, G.F. and McKinney, H.H. (1966). Aberrant ratio: an anomaly in maize associated with virus infection. *Genetics* **54**, 1287–1296.

Sprague, G.F. and McKinney, H.H. (1971). Further evidence on the genetic behavior of AR in maize. *Genetics* **67**, 533–542.

Sprague, G.F., McKinney, H.H. and Greeley, L.W. (1963). Virus as a mutagenic agent in maize. *Science* **141**, 1052–1053.

Sta Cruz, F.C., Koganezawa, H. and Hibino, H. (1993). Comparative cytology of rice tungro viruses in selected rice cultivars. *J. Phytopathol.* **138**, 274–282.

Stace-Smith, R. and Hamilton, R.I. (1988). Inoculum thresholds of seed borne pathogens: viruses. *Phytopathology* **78**, 875–880.

Stace-Smith, R. and Martin, R.R. (1993). Virus purification in relation to virus diagnosis. In: R.E.F. Matthews (ed.) *Diagnosis of Plant Viruses*, pp. 129–158. CRC Press, Boca Raton.

Stack, J.P. and Tattar, T.A. (1978). Measurement of transmembrane electropotentials of *Vigna sinensis* leaf cells infected with tobacco ringspot virus. *Physiol. Plant Pathol.* **12**, 173–178.

Staehelin, A. (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* **11**, 1151–1165

Stahl, E. (1894). Einige Versuche über Transpiration und Assimilation. *Bot. Z.* **6/7**, 117–145.

Stanley, J. (1983). Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs. *Nature (London)* **305**, 643–645.

Stanley, J. (1995). Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* **206**, 707–712.

Stanley, J. and Gay, M.R. (1983). Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. *Nature (London)* **301**, 260–262.

Stanley, J. and Townsend, R. (1985). Characterisation of DNA forms associated with cassava latent virus infection. *Nucl. Acids Res.* **13**, 2189–2206.

Stanley, J., Hanau, R. and Jackson, A.O. (1984). Sequence comparison of the 3′ ends of a subgenomic RNA and the genomic RNAs of barley stripe mosaic virus. *Virology* **139**, 375–383.

Stanley, J., Townsend, R. and Curson, S.J. (1985). Pseudorecombinants between cloned DNAs of two isolates of cassava latent virus. *J. Gen. Virol.* **66**, 1055–1061.

Stanley, J., Markham, P.G., Callis, R.J. and Pinner, M.S. (1986). The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus. *EMBO J.* **5**, 1761–1767.

Stanley, J., Saunders, K., Pinner, M.S. and Wong, S.M. (1997). Novel defective interfering DNAs associated with Ageratum yellow vein geminivirus infection of *Ageratum conyzoides*. *Virology* **239**, 87–96.

Stanley, W.M. (1935). Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. *Science* **81**, 644–645.

Stanley, W.M. (1936). Chemical studies on the virus of tobacco mosaic virus. VI. The isolation from diseased turkish tobacco plants of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* **26**, 305–320.

Stansfield, I., Jones, K.M. and Tuite, M.F. (1995). The end is in sight: terminating translation in eukaryotes. *Trends Biol. Sci.* **20**, 489–491.

StarkLorenzen, P., Guitton, M.C., Werner, R. and Muhlbach, H.P. (1997). Detection and tissue distribution of potato spindle tuber viroid in infected tomato plants by tissue print hybridization. *Arch. Virol.* **142**, 1289–1296.

Stauffacher, C.V., Usha, R., Harrington, M., Schmidt, T., Hosur, M.V. and Johnson, J.E. (1985). The structure of cowpea mosaic virus at 3.5 Å resolution. *NATO Adv. Sci. Inst. Ser., Ser. A* **126**, 293–308.

Steckert, J.J. and Schuster, T.M. (1982). Sequence specificity of trinucleoside diphosphate binding to polymerised tobacco mosaic virus protein. *Nature (London)* **299**, 32–36.

Steere, R.L. (1969). Freeze-etching simplified.*Cryobiology* **5**, 306–323.

Steger, G., Hofmann, H. Förtsch, J. *et al.* (1984). Conformational transitions in viroids and virusoids: comparison of results from energy minimization algorithms and from experimental data. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2**, 543–571.

Steger, G., Tabler, M., Brüggermann, W. *et al.* (1986). Structure of viroid replicative intermediates: physico-chemical studies on SP6 transcripts of cloned oligomeric potato spindle tuber viroid. *Nucl. Acids Res.* **14**, 9613–9630.

Steinhauer, D., Domingo, E. and Holland, J.J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* **122**, 281–288.

Stenger, D.C. (1994). Strain-specific mobilization and amplification of a transgenic defective-interfering DNA of the geminivirus beet curly top virus. *Virology* **203**, 397–402.

Stenger, D.C., Revington, G.N., Stevenson, M.C. and Bisaro, D.M. (1991). Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 8029–8033.

Steven, A.C., Trus, B.L., Putz, C. and Wurtz, M. (1981). The molecular organisation of beet necrotic yellow vein virus. *Virology* **113**, 428–438.

Stevens, C. and Gudauskas, R.T. (1983). Effects of maize dwarf mosaic virus infection of corn on inoculum potential of *Helminthosporium maydis* race 0. *Phytopathology* **73**, 439–441.

Stevens, M., Hull, R. and Smith, H.G. (1997). Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of beet yellows closterovirus in plants and aphids. *J. Virol. Methods* **68**, 9–16.

Stewart, C.-B. and Wilson, A.C. (1987). Sequence convergence and functional adaptation of stomach lysozymes from foregut fermenters. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**, 891–899.

Stirling, G.R. (1999). Increasing the adoption of sustainable, integrated management strategies for soilborne diseases of high-value annual crops. *Aust. J. Plant Pathol.* **28**, 72–79.

Stobbs, L.W. and McNeill, B.H. (1980). Increase of tobacco mosaic virus in graft-inoculated TMV resistant tomatoes. *Can. J. Plant Pathol.* **2**, 217–221.

Stobbs, L.W., Manocha, M.S. and Dias, H.F. (1977). Histological changes associated with virus localization in TMV-infected pinto bean leaves. *Physiol. Plant Pathol.* **11**, 87–94.

Stoeckle, M.Y., Shaw, M.W. and Choppin, P.W. (1987). Segment-specific and common nucleotide sequences in the non-coding regions of influenza B virus genome RNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 2703–2707.

Stollar, B.D. (1975). The specificity and applications of antibodies to helical nucleic acids. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **3**, 45–69.

Stommel, J.R., Tousignant, M.E., Wai, T., Pasini, R. and Kaper, J.M. (1998). Viral satellite RNA expression in transgenic tomato confers field tolerance to cucumber mosaic virus. *Plant Dis.* **82**, 391–396.

Storms, M.M.H. (1998). The role of NS_M during tomato spotted wilt virus infection. PhD thesis, University of Wageningen, Netherlands.

Storms, M.M.H., Kormelink, R., Peters, D., van Lent, J.W.M. and Goldbach, R.W. (1995). The non-structural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and animal cells. *Virology* **214**, 485–493.

Storms, M.M.H., van der Schoot, C., Prins, M., Kormelink, R., van Lent, J.W.M. and Goldbach, R.W. (1998). A comparison of two methods of microinjection for assessing altered plasmodesmatal gating in tissues expressing viral proteins. *Plant J.* **13**, 131–140.

Stouffer, R.F. and Ross, A.F. (1961). Effect of infection by potato virus Y on the concentration of potato virus X in tobacco plants. *Phytopathology* **51**, 740–744.

Stratford, R. and Covey, S.N. (1988). Changes in turnip leaf messenger RNA populations during systemic infections by severe and mild strains of cauliflower mosaic virus. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **1**, 243–249.

Stratford, R. and Covey, S.N. (1989). Segregation of cauliflower mosaic virus symptom genetic determinants. *Virology* **172**, 451–459.

Stratford, R., Plastkitt, K.A., Turner, D.S., Markham, P.G. and Covey, S.N. (1988). Molecular properties of Bari 1, a mild strain of cauliflower mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **69**, 2375–2386.

Stubbs, G. (1999). Tobacco mosaic virus particle structure and the initiation of disassembly. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **354**, 551–557.

Stubbs, G., Warren, S. and Holmes, K. (1977). Structure of RNA and RNA binding site in tobacco mosaic virus from a 4 Å map calculated from X-ray fibre diagrams. *Nature (London)* **267**, 216–221.

Stubbs, L.L. (1956). Motley dwarf virus disease of carrot in California. *Plant Dis. Rep.* **40**, 763–764.

Stupina, V. and Simon, A.E. (1997). Analysis *in vivo* of turnip crinkle virus satellite RNA C variants with mutations in the 3′ terminal minus-strand primer. *Virology* **238**, 470–477.

Stussi-Garaud, C., Garaud, J.-C., Berna, A. and Godefroy-Colburn, T. (1987). *In situ* location of an alfalfa mosaic virus non-structural protein in plant cell walls: correlation with virus transport. *J. Gen. Virol.* **68**, 1779–1784.

Su, L., Chen, L., Egli, M., Berger, J.M. and Rich, A. (1999). Minor groove RNA triplex in the crystal structure of a ribosomal frameshifting viral pseudoknot. *Nature Struct. Biol.* **6**, 285–292.

Sugimura, Y. and Matthews, R.E.F. (1981). Timing of the synthesis of empty shells and minor nucleoproteins in relation to turnip yellow mosaic virus synthesis in *Brassica* protoplasts. *Virology* **112**, 70–80.

Sugiyama, Y., Hamamoto, H., Takemoto, S., Watanabe, Y. and Okada, Y. (1995). Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus. *FEBS Lett.* **359**, 247–250.

Sullivan, M.L. and Ahlquist, P. (1997). *cis*-acting signals in bromovirus RNA replication and gene expression: networking with viral proteins and host factors. *Sem. Virol.* **8**, 221–230.

Sullivan, M.L. and Ahlquist, P. (1999). A brome mosaic virus intergenic RNA3 replication signal functions with viral replication protein 1a to dramatically stabilize RNA *in vivo*. *J. Virol.* **73**, 2622–2632.

Sulzinski, M.A. and Zaitlin, M. (1982). Tobacco mosaic virus replication in resistant and susceptible plants: In some resistant species virus is confined to a small number of initially infected cells. *Virology* **121**, 12–19.

Sulzinski, M.A., Gabard, K.A., Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1985). Replication of tobacco mosaic: VIII. Characterisation of a third subgenomic TMV RNA. *Virology* **145**, 132–140.

Sumner, J.B. (1926). The isolation and crystallisation of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* **69**, 435–441.

Sun, J.-H. and Kao, C.C. (1997a). Characterization of RNA products associated with or aborted by a virus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **236**, 348–353.

Sun, J.-H. and Kao, C.C. (1997b). RNA synthesis by brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase transition from initiation to elongation. *Virology* **233**, 63–73.

Sundaraman, V.P., Strömvik, M.V. and Vodkin, L.O. (2000). A putative defective interfering RNA from bean pod mottle virus. *Plant Dis.* **84**, 1309–1313.

Sunter, G. and Bisaro, D.M. (1989). Transcription map of the B genome component of tomato golden mosaic virus and comparison with A component transcripts. *Virology* **173**, 647–655.

Sunter, G. and Bisaro, D.M. (1991). Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* **180**, 416–419.

Sunter, G. and Bisaro, D.M. (1997). Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology* **232**, 269–280.

Sunter, G., Hartitz, M.D. and Bisaro, D.M. (1993). Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: autoregulation of gemini-virus replication protein. *Virology* **195**, 275–280.

Sunter, G., Sunter, J.L. and Bisaro, D.M. (2001). Plants expressing tomato golden mosaic virus AL2 or beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology* **285**, 59–70.

Susi, P. (1999). Replication in the phloem is not necessary for efficient vascular transport of tobacco mosaic tobamovirus. *FEBS Lett.* **447**, 121–123.

Susi, P. (2000). Dye-coupling in tobacco mesophyll cells surrounding growing tobacco mosaic tobamovirus-induced local lesions. *J. Phytopathol.* **148**, 379–382.

Suzuki, M., Kuwata, S., Masuta, C. and Takanami, Y. (1995). Point mutations in the coat protein of cucumber mosaic virus affect symptom expression and virion accumulation in tobacco. *J. Gen. Virol.* **76**, 1791–1799.

Suzuki, N., Kudo, T., Shirako, Y., Ehara, Y. and Tachibana, T. (1989). Distribution of cylindrical inclusion, amorphous inclusion, and capsid proteins of watermelon mosaic virus 2 in systemically infected pumpkin leaves. *J. Gen. Virol.* **70**, 1085–1091.

Swaans, H. and van Kammen, A. (1973). Reconsideration of the distinction between the severe and yellow strains of cowpea mosaic virus. *Neth. J. Plant Pathol.* **79**, 257–265.

Swanson, M.M., Brown, J.K., Poulos, B.T. and Harrison, B.D. (1992). Genome affinities and epitope profiles of whitefly-transmitted geminiviruses from the Americas. *Ann. Appl. Biol.* **121**, 285–296.

Sweet, J.B. (1975). Soil-borne viruses occurring in nursery soils and infecting some ornamental species of Rosaceae. *Ann. Appl. Biol.* **79**, 49–54.

Sweet, J.B. (1980). Hedgerow hawthorn (*Crataegus* spp.) and blackthorn (*Prunus spinosa*) as hosts of fruit tree viruses in Britain. *Ann. Appl. Biol.* **94**, 83–90.

Swinkels, P.P.H. and Bol, J.F. (1980), Limited sequence variation in the leader sequence of RNA4 from several strains of alfalfa mosaic virus. *Virology* **106**, 145–147.

Syller, J., Marczewski, W. and Pawlowicz, J. (1997). Transmission by aphids of potato spindle tuber viroid encapsidated by potato leafroll luteovirus particles. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**, 285–289.

Sylvester, E.S. (1969). Evidence for transovarial passage of sow thistle yellow vein virus in the aphid *Hyperomyzus lactucae*. *Virology* **38**, 440–446.

Sylvester, E.S. (1973). Reduction of excretion, reproduction and survival in *Hyperomyzus lactucae* fed on plants infected with isolates of sowthistle yellow vein virus. *Virology* **56**, 632–635.

Sylvester, E.S. and Richardson, J. (1970). Infection of *Hyperomyzus lactucae* by sowthistle yellow vein virus. *Virology* **42**, 1023–1042.

Sylvester, E.S. and Richardson, J. (1971). Decreased survival of *Hyperomyzus lactucae* inoculated with serially passed sowthistle yellow vein virus. *Virology* **46**, 310–317.

Sylvester, E.S. and Richardson, J. (1981). Inoculation of the aphids *Hyperomyzus lactucae* and *Chaetosiphon jacobi* with isolates of sowthistle yellow vein virus and strawberry crinkle virus. *Phytopathology* **71**, 598–602.

Sylvester, E.S., Richardson, J. and Frazier, N.W. (1974). Serial passage of strawberry crinkle virus in the aphid *Chaetosiphon jacobi*. *Virology* **59**, 301–306.

Symons, R.H. (1978). The two-step purification of ribosomal RNA and plant viral RNA by polyacrylamide slab gel electrophoresis. *Aust. J. Biol. Sci.* **31**, 25–37.

Symons, R.H. (1997). Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucl. Acids Res.* **25**, 2683–2689.

Symons, R.H. and Randles, J.W. (1999). Encapsidated circular viroid-like satellite RNAs (virusoids) of plants. In: P.K. Vogt and A.O. Jackson (eds) *Satellites and Defective RNAs*, pp. 81–105. Springer, Berlin.

Symons, R.H., Haseloff, J., Visvader, J.E. *et al.* (1985). On the mechanism of replication of viroids, virusoids and satellite RNAs. In: K. Maramorosch and J.J. McKelvey, Jr. (eds) *Subviral Pathogens of Plants and Animals: Viroids and Prions*, pp. 235–263. Academic Press, Orlando, FL.

Symons, R.H., Hutchins, C.J., Forster, A.C., Rathjen, P.D., Keese, P. and Visvader, J.E. (1987). Self cleavage of RNA in the replication of viroids and virusoids. *J. Cell Sci. Suppl.* **7**, 303–318.

Syvänen, A.-C., Laaksonen, M.. and Soderlund, H. (1986). Fast quantitation of nucleic acid hybrids by affinity-based hybrid collection. *Nucl. Acids Res.* **14**, 5037–5048.

Szatmari-Goodman, G. and Nault, L.R. (1983). Tests of oil sprays for suppression of aphid-borne maize dwarf mosaic virus in Ohio sweet corn. *J. Econ. Entomol.* **76**, 144–149.

Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G. *et al.* (1999). The *rde-1* gene, RNA interference and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**, 123–132.

Tabler, M., Tsagris, M. and Hammond, J. (1998). Antisense and ribozyme mediated resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 79–93. APS Press, St. Paul, MN.

Tacke, E. Prüfer, D., Salamini, F. and Rohde, W. (1990). Characterization of a potato leafroll luteovirus subgenomic RNA: differential expression by internal translation initiation and UAG suppression. *J. Gen. Virol.* **71**, 2265–2272.

Tacke, E., Salamini, F. and Rohde, W. (1996). Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. *Nature Biotechnol.* **14**, 1597–1601

Takahashi, H. and Ehara, Y. (1993). Severe chlorotic spot symptoms in cucumber mosaic virus strain Y-infected tobaccos are induced by a combination of the virus coat protein gene and two host recessive genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**, 182–189.

Takahashi, T. (1971). Studies on viral pathogenesis in plant hosts: I. Relation between host leaf age and the formation of systemic symptoms induced by tobacco mosaic virus. *Phytopathol. Z.* **71**, 275–284.

Takahashi, T. (1972a). Studies on viral pathogenesis in plant hosts. II. Changes in developmental morphology of tobacco plants infected systemically with tobacco mosaic virus. *Phytopathol. Z.* **74**, 37–47.

Takahashi, T. (1972b). Studies on viral pathogenesis in plant hosts. III. Leaf age-dependent susceptibility to tobacco mosaic virus infection in 'Samsun NN' and 'Samsun' tobacco plants. *Phytopathol. Z.* **75**, 140–155.

Takahashi, T. and Diener, T.O. (1975). Potato spindle tuber viroid. XIV. Replication in nuclei isolated from infected leaves. *Virology* **64**, 106–114.

Takahashi, W.N. (1956). Increasing the sensitivity of the local-lesion method of virus assay. *Phytopathology* **46**, 654–656.

Takahashi, W.N. and Rawlins, T.E. (1932). Method for determining shape of colloidal particles: application in study of tobacco mosaic virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **30**, 155–157.

Takamatsu, N., Ohno, T., Meshi, T. and Okada, Y. (1983). Molecular cloning and nucleotide sequence of the 30K and the coat protein cistron of TMV (tomato strain) genome. *Nucleic Acids Res.* **11**, 3767–3778.

Takamatsu, N., Ishikawa, M., Meshi, T. and Okada, Y. (1987). Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. *EMBO J.* **6**, 307–311.

Takamatsu, N., Watanabe, Y., Meshi, T. and Okada, Y. (1990a). Mutational analysis of the pseudoknot region in the 3 noncoding region of TMV RNA J. *Virology* **64**, 3686–3693.

Takamatsu, N., Watanabe, Y., Yanagi, H., Meshi, T., Shiba, T. and Okada, Y. (1990b). Production of enkephalin in tobacco protoplasts using tobacco mosaic virus RNA vector. *FEBS Lett.* **269**, 73-76.

Takamatsu, N., Watanabe, Y., Iwasaki, T., Shiba, T., Meshi, T. and Okada, Y. (1991). Deletion analysis of the 5′ untranslated leader sequence of tobacco mosaic virus RNA. *J. Virol.* **65**, 1619–1622.

Takanami, Y. (1981). A striking change in symptoms on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology* **109**, 120–126.

Takanami, Y., Kubo, S. and Imaizumi, S. (1977). Synthesis of single- and double-stranded cucumber mosaic virus RNAs in tobacco mesophyll protoplasts. *Virology* **80**, 376–389.

Takanami, Y., Nitta, N. and Kubo, S. (1989). A marked improvement of efficiency in infection of tobacco mesophyll protoplasts with plant viruses and virus RNAs by using polyethyleneimine as a polycation. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* **55**, 324–329.

Takatsuji, H., Hirochika, H., Fukushi, T. and Ikeda, J.-E. (1986). Expression of cauliflower mosaic virus reverse transcriptase in yeast. *Nature (London)* **319**, 240–243.

Takatsuji, H., Yamauchi, H., Watanabe, S., Kato, H. and Ikeda, J.-E. (1992). Cauliflower mosaic virus reverse transcriptase: activation by proteolytic processing and functional alteration by terminal deletion. *J. Biol. Chem.* **267**, 11579–11585.

Takebe, I. (1977). Protoplasts in the study of plant virus replication. *Compr. Virol.* **11**, 237–283.

Takebe, I. and Otsuki, Y. (1969). Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **64**, 843–848.

Takebe, I., Otsuki, Y. and Aoki, S. (1968). Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *Plant Cell Physiol.* **9**, 115–124.

Takebe, I., Otsuki, Y., Honda, Y. and Matsui, C. (1975). Penetration of plant viruses into isolated tobacco leaf protoplasts. In: T. Hasegawa (ed.) *Proceedings of the First Intersectional Congress of the International Association of Microbiological Societies*, Vol. 3, pp. 55–64. Science Council of Japan, Tokyo.

Takemoto, Y. and Hibi, T. (2001). Genes Ia, II, III, IV and V of soybean chlorotic mottle virus are essential but the gene Ib is non-essential for systemic infection. *J. Gen. Virol.* **82**, 1481–1489.

Taliansky, M. and Barker, H. (1999). Movement of luteoviruses in infected plants. In: H.G. Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp. 69–81. CAB International, Wallingford, UK.

Taliansky, M.E. and Robinson, D.J. (1997). Trans-acting untranslated elements of groundnut rosette virus satellite RNA are involved in symptom production. *J. Gen. Virol.* **78**, 1277–1285.

Taliansky, M.E., Atabekova, T.I. and Atabekov, J.G. (1977). The formation of phenotypically mixed particles upon mixed assembly of some tobacco mosaic virus (TMV) strains. *Virology* **76**, 701–708.

Taliansky, M.E., Atabekova, T.I., Kaplan, I.B., Morozov, S. Yu., Malyshenko, S.I. and Atabekov, J.G. (1982a). A study of TMV *ts* mutant Ni2519: I. Complementation experiments. *Virology* **118**, 301–308.

Taliansky, M.E., Malyshenko, S.I., Pshennikova, E.S., Kaplan, I.B., Ulanova, E.F. and Atabekov, J.G. (1982b). Plant virus-specific transport function: I. Virus genetic control required for systemic spread. *Virology* **122**, 318–326.

Taliansky, M.E., Malyshenko, S.I., Pshennikova, E.S. and Atabekov, J.G. (1982c). Plant virus-specific transport function. II. A factor controlling virus host range. Virology **122**, 327–331.

Taliansky, M.E., Robinson, D.J. and Murant, A.F. (1996). Complete nucleotide sequence and organization of the RNA genome of groundnut rosette umbravirus. *J. Gen. Virol.* **77**, 2335–2345.

Taliansky, M.E., Ryabov, E.V. and Robinson, D.J. (1998). Two distinct mechanisms of transgenic resistance mediated by groundnut rosette virus satellite RNA sequences. *Mol. Plant Microb. Interact.* **11**, 367–374.

Talley, J., Warren, F.H.J.B., Torrance, L. and Jones, R.A.C. (1980). A simple kit for detection of plant viruses by the latex serological test. *Plant Pathol.* **29**, 77–79.

Tamada, T. (1999). Benyviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 154–160. Academic Press, San Diego.

Tamada, T., Harrison, B.D. and Roberts, I.M. (1984). Variation among British isolates of potato leafroll virus. *Ann. Appl. Biol.* **104**, 107–116.

Tamada, T., Schmitt, C., Saito, M., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G. (1996). High resolution analysis of the readthrough domain of beet necrotic yellow vein virus readthrough protein: a KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polymyxa betae*. *J. Gen. Virol.* **77**, 1359–1367.

Tamburro, A.M., Guantieri, V., Piazzolla, P. and Gallitelli, D. (1978). Conformational studies on particles of turnip yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **40**, 337–344.

Tamm, T. and Truve, E. (2000). Sobemoviruses. *J. Virol.* **74**, 6231–6241.

Tanguay, R.L. and Gallie, D.R. (1996). Isolation and characterization of the 102-kilodalton RNA-binding protein that binds to the 5′ and 3′ translational enhancers of tobacco mosaic virus RNA. *J. Biol. Chem.* **271**, 14316–14322.

Tanzi, M., Betti, L., de Jager, C.P. and Canova, A. (1986). Isolation of an attenuated virus mutant obtained from a TMV pepper strain after treatment with nitrous acid. *Phytopathol. Mediterr.* **25**, 119–124.

Taraporewala, Z.F. and Culver, J.N. (1996). Identification of an elicitor active site within the three-dimensional structure of the tobacco mosaic tobamovirus coat protein. *Plant Cell* **8**, 169–178.

Taraporewala, Z.F. and Culver, J.N. (1997). Structural and functional conservation of the tobamovirus coat protein elicitor active site. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 597–604.

Tatchell, G.M., Plumb, R.T. and Carter, N. (1988). Migration of alate morphs of the bird cherry aphis (*Rhopalosiphum padi*) and implications for the epidemiology of barley yellow dwarf virus. *Ann. Appl. Biol.* **112**, 1–11.

Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A. and Galeffi, P. (1993). Transgenic plants expressing functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* **366**, 469–472.

Taylor, C.E. and Murant, A.F. (1968). Chemical control of raspberry ringspot and tomato black ring viruses in strawberry. *Plant Pathol.* **17**, 171–178.

Taylor, C.E. and Thomas, P.R. (1968). The association of *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletsky) with strawberry latent ringspot and arabis mosaic viruses in a raspberry plantation. *Ann. Appl. Biol.* **62**, 147–157.

Taylor, D.N. and Carr, J.P. (2000). The GCD10 subunit of yeast eIF-3 binds the methyltransferase-like domain of the 126- and 183-kDa replicase proteins of tobacco mosaic virus in the yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.* **81**, 1587–1591.

Taylor, G.A., Lewis, G.D. and Rubatzky, V.E. (1969). The influence of time of tobacco mosaic virus inoculation and stage of fruit maturity upon the incidence of tomato internal browning. *Phytopathology* **59**, 732–736.

Taylor, K.M., Spall, V.E., Butler, P.J.G. and Lomonossoff, G.P. (1999). The cleavable carboxyl-terminus of the small coat protein of cowpea mosaic virus is involved in RNA encapsidation. *Virology* **255**, 129–137.

Taylor, L.R. (1986). The distribution of virus disease and the migrant vector aphid. In: G.D. McLean, R.G. Garrett and W.G. Ruesink (eds) *Plant Virus Epidemics*, pp. 35–57. Academic Press, Orlando, FL.

Teakle, D.S. (1986). Abiotic transmission of southern bean mosaic virus in soil. *Aust. J. Biol. Sci* **39**, 353–359.

Técsi, L.I., Maule, A.J., Smith, A.M. and Leegood, R.C. (1994a). Complex, localized changes in CO_2 assimilation and starch content associated with the susceptible interaction between cucumber mosaic virus and a cucurbit host. *Plant J.* **5**, 837–847.

Técsi, L.I., Maule, A.J., Smith, A.M. and Leegood, R.C. (1994b). Metabolic alterations in cotyledons of *Cucurbita pepo* infected by cucumber mosaic virus. *J. Exp. Bot.* **45**, 1541–1551.

Temmink, J.H.M. and Campbell, R.N. (1969). The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. III. Infection of host roots. *Can. J. Bot.* **47**, 421–424.

Teng, P.S. (ed.) (1987). *Crop Loss Assessment and Pest Management*. American Phytopathology Society Press, St Paul, MN.

Tenllado, F. and Bol, J.F. (2000). Genetic dissection of the multiple functions of alfalfa mosaic virus coat protein in viral RNA replication, encapsidation and movement. *Virology* **268**, 29–40.

Tepfer, M. (1993). Viral genes and transgenic plants. *Biotechnology* **11**, 1125–1132.

Terryn, N. and Rouzé, P. (2000). The sense of naturally transcribed antisense RNAs in plants. *Trends Plant Sci.* **5**, 394–396.

Teycheney, P.-Y. and Tepfer, M. (2001). Virus-specific spatial differences in the interface with silencing of the *chs-A* gene in non-transgenic petunia. *J. Gen. Virol.* **82**, 1239–1243.

Teycheney, P.-Y., Aaziz, R., Dinant, S. *et al.* (2000). Synthesis of (–)-strand RNA from the 3′ untranslated region of plant viral genomes expressed in transgenic plants upon infection with related viruses. *J. Gen. Virol.* **81**, 1121–1126.

Thole, V. and Hull, R. (1996). Rice tungro spherical virus: nucleotide sequence of the 3′ genomic half and studies on the two small 3′ open reading frames. *Virus Genes* **13**, 239–246.

Thole, V. and Hull, R. (1998). Rice tungro spherical virus polyprotein processing: identification of a virus-coded protease and mutational analysis of putative cleavage sites. *Virology* **247**, 106–114.

Thole, V., Miglino, R. and Bol, J.F. (1998). Amino acids of alfalfa mosaic virus coat protein that direct formation of unusually long virus particles. *J. Gen. Virol.* **79**, 3139–3143.

Thomas, A.A.M., ter Haar, E., Wellink, J. and Voorma, H.O. (1991). Cowpea mosaic virus middle component RNA contains a sequence that allows internal binding of ribosomes and that requires eukaryotic initiation factor 4F for optimal translation. *J. Virol.* **65**, 2953–2959.

Thomas, C.L. and Maule, A.J. (1995a). Identification of the cauliflower mosaic virus movement protein RNA-binding domain. *Virology* **206**, 1145–1149.

Thomas, C.L. and Maule, A.J. (1995b). Identification of structural domains within cauliflower mosaic virus movement protein by scanning deletion mutagenesis and epitope tagging. *Plant Cell* **7**, 561–572.

Thomas, C.L. and Maule, A.J. (1999). Identification of inhibitory mutants of cauliflower mosaic virus movement protein function after expression in insect cells. *J. Virol.* **73**, 7886–7890.

Thomas, C.L., Perbal, C. and Maule, A.J. (1993). A mutation of cauliflower mosaic virus gene 1 interferes with virus movement but not virus replication. *Virology* **192**, 415–421.

Thomas, C.M., Hull, R., Bryant, J.A. and Maule, A.J. (1985). Isolation of a fraction from cauliflower mosaic virus-infected protoplasts which is active in the synthesis of (+) and (–) strand viral DNA and reverse transcription of primed RNA templates. *Nucl. Acids Res.* **13**, 4557–4576.

Thomas, J.E., Smith, M.K., Kessling, A.F. and Hamill, S.D. (1995). Inconsistent transmission of banana bunchy top virus in micropropagated bananas and its implications for germplasm screening. *Aust. J. Agric. Res.* **46**, 663–671.

Thomas, P.E. (1970). Isolation and differentiation of five strains of curly top virus. *Phytopathology* **60**, 844–848.

Thomas, P.E., Hassan, S. and Mink, G.I. (1988). Influence of light quality on translocation of tomato yellow top virus and potato leafroll virus in *Lycopersicon peruvianum* and some of its tomato hybrids. *Phytopathology* **78**, 1160–1164.

Thomas, P.E., Kaniewski, W.K. and Lawson, E.C. (1997). Reduced field spread of potato leafroll virus in potatoes transformed with potato leafroll virus coat protein gene. *Plant Dis.* **8**, 1447–1453.

Thomas, W. (1973). Control of *Olpidium brassicae*, the vector of cucumber systemic necrosis and bean stipple streak virus diseases. *N. Z. J. Exp. Agric.* **1**, 92–96.

Thompson, A.D. (1961). Effect of tobacco mosaic virus and potato virus Y on infection by potato virus X. *Virology* **13**, 262–264.

Thompson, D.L. and Hebert, T.T. (1970). Development of maize dwarf mosaic symptoms in eight phytotron environments. *Phytopathology* **60**, 1761–1764.

Thompson, G.A. and Schulz, A. (1999). Macromolecular trafficking in the phloem. *Trends Plant Sci.* **4**, 354–360.

Thompson, J.R. and García-Arenal, F. (1998). The bundle sheath-phloem interface of *Cucumis sativus* is a boundary to systemic infection by tomato aspermy virus. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **11**, 109–114.

Thompson, S., Fraser, R.S.S. and Barnden, K.L. (1988). A beneficial effect of trypsin on the purification of turnip mosaic virus (TuMV) and other potyviruses. *J. Virol. Meth.* **20**, 57–64.

Thompson, W.R., Meinwald, J., Aneshansley, D. and Eisner, T. (1972). Flavonols: pigments responsible for ultraviolet absorption in nectar guide of flower. *Science* **177**, 528–530.

Thompson, W.W., Weier, T.E. and Drever, H. (1964). Electron-microscopic studies on chloroplasts from phosphorus deficient plants. *Am. J. Bot.* **51**, 933–938.

Thomson, A.D. (1961). Effect of tobacco mosaic virus and potato virus Y on infection by potato virus X. *Virology* **13**, 262–264.

Thomson, A.D. (1976). Virus diseases of *Solanum laciniatum* Ait. in New Zealand. *N. Z. J. Agric. Res.* **19**, 521–527.

Thomson, A.D. and Ferguson, J.D. (1976). Effect of varying the nutrient supply on response of pea plants to pea leaf roll. *N. Z. J. Agric. Res.* **19**, 529–533.

Thongmeearkom, P., Ford, R.E. and Jedlinski, H. (1976). Aphid transmission of maize dwarf mosaic virus strains. *Phytopathology* **66**, 332–335.

Thornbury, D.W. and Pirone, T.P. (1983). Helper components of two potyviruses are serologically distinct. *Virology* **125**, 487–490.

Thornbury, D.W., Hellmann, G.M., Rhoads, R.E. and Pirone, T.P. (1985). Purification and characterisation of potyvirus helper component. *Virology* **144**, 260–267.

Thottappilly, G., Dahal, G. and Lockhart, B.E.L. (1998). Studies on a Nigerian isolate of banana streak badnavirus. 1. Purification and enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Appl. Biol.* **132**, 253–261.

Thresh, J.M. (1958). The spread of virus diseases in Cacao. *West Afr. Cacao Res. Inst. Tech. Bull.* **5**, 1–36.

Thresh, J.M. (1966). Field experiments on the spread of blackcurrant reversion virus and its gall mite vector (*Phytoptus ribis* Nal). *Ann. Appl. Biol.* **58**, 219–230.

Thresh, J.M. (1980). The origins and epidemiology of some important plant viruses diseases. In: T.H. Coaker (ed.) *Applied Virology*, Vol. VII, pp. 1–65. Academic Press, London.

Thresh, J.M. (1982). Cropping practices and virus spread. *Annu. Rev. Phytopathol.* **20**, 193–218.

Thresh, J.M. (1983). Progress curves of plant virus disease. *Adv. Appl. Biol.* **8**, 1–85.

Thresh, J.M. (1988a). Rice viruses and 'the green revolution'. *Aspects Appl. Biol.* **17**, 187–194.

Thresh, J.M. (1988b). Eradication as a virus disease control measure. In: B.C. Clifford and E. Lester (eds) *Control of Plant Diseases: Costs and Benefits*, pp. 155–194. Blackwell, Oxford.

Thresh, J.M. (1989a). Insect-borne viruses of rice and the green revolution. *Trop. Pest Manag.* **35**, 264–272.

Thresh, J.M. (1989b). Plant virus epidemiology: the battle of the genes. *NATO Adv. Res. Workshop: Recognition Response Plant Virus Interact., 1989.*

Thresh, J.M. and Otim-Nape, G.W. (1994). Strategies for controlling African cassava mosaic geminivirus. *Adv. Vector Dis. Res.* **10**, 215–236.

Tian, T., Rubio, L., Yeh, H.-H., Crawford, B. and Falk, B.W. (1999). Lettuce infectious yellows virus: *in vitro* acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *J. Gen. Virol.* **80**, 1111–1117.

Tien, P., and Wu, G. (1991). Satellite RNA for the biocontrol of plant disease. *Adv. Virus Res.* **39**, 321–339.

Tien, P., Zhang, X., Qiu, B., Qin, B. and Wu, G. (1987). Satellite RNA for the control of plant diseases caused by cucumber mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* **111**, 143–152.

Timchenko, T., de Kouchkovsky, F., Katul, L., David, C., Vetten, H.J. and Gronenborn, B. (1999). A single Rep protein initiates

replication of multiple genome components of faba bean necrotic yellows virus, a single-stranded DNA virus of plants. *J. Virol.* **73**, 10173–10182.

Timchenko, T., Katul, L., Sano, Y., de Kouchkovsky, F., Vetten, H.J. and Gronenborn, B. (2000). The master Rep concept in nanovirus replication: identification of missing genome components and potential for natural genetic reassortment. *Virology* **274**, 189–195.

Timian, R.G. (1974). The range of symbiosis of barley and barley stripe mosaic virus. *Phytopathology* **64**, 342–345.

Timian, R.G. (1975). Barley stripe mosaic virus and the world collection of barleys. *Plant Dis. Rep.* **59**, 984-988.

Timmermans, M.C.P., Das, O.P. and Messing, J. (1992). Trans replication and high copy numbers of wheat dwarf virus vectors in maize cells. *Nucl. Acids Res.* **40**, 4047–4054.

Timmermans, M.C.P., Das, O.P. and Messing, J. (1994). Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **45**, 79–112.

Tingey, W.M. and Laubengayer, J.E. (1981). Defense against the green peach aphid and potato leafhopper by glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. *J. Econ. Entomol.* **74**, 721–725.

Tinsley, T.W. (1953). The effects of varying the water supply of plants on their susceptibility to infection with viruses. *Ann. Appl. Biol.* **40**, 750–760.

Tobiás, I., Rast, A.Th.B. and Maat, D.Z. (1982). Tobamoviruses of pepper, eggplant and tobacco: comparative host reactions and serological relationships. *Neth. J. Plant Pathol.* **88**, 257–268.

Todd, J.M. (1958). Spread of potato virus X over a distance. *Proc. Conf. Potato Virus Dis., 3rd, 1957*, pp. 132–143.

Todd, J.M. (1961). The incidence and control of aphid-borne potato virus diseases in Scotland. *Eur. Potato J.* **4**, 316–329.

Toedt, J.M., Braswell, E.H., Schuster, T.M., Yphantis, D.A., Taraporewala, Z.F. and Culver, J.N. (1999). Biophysical characterization of a designed TMV coat protein mutant, R46G, that elicits a moderate hypersensitive response in *Nicotiana sylvestris*. *Protein Sci.* **8**, 261–270.

Toh, H., Hayashida, H. and Miyata, T. (1983). Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative poly merases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature (London)* **305**, 827–829.

Tollin, P. and Wilson, H.R. (1971). Some observations on the structure of the Campinas strain of tobacco rattle virus. *J. Gen. Virol.* **13**, 433–440.

Tollin, P. and Wilson, H.R. (1988). Particle structure. In: R.G. Milne (ed.) *The Plant Viruses. Vol. 4. The Filamentous Plant Viruses*, pp. 51–83. Plenum Press, New York.

Tollin, P., Wilson, H.R., Roberts, I.M. and Murant, A.F. (1992). Diffraction studies of the particles of two closteroviruses: heracleum latent virus and heracleum virus 6. *J. Gen. Virol.* **73**, 3045–3048.

Tomassoli, L., Ilardi, V., Barba, M. and Kaniewski, W. (1999). Resistance of transgenic tomato to cucumber mosaic cucumovirus under field conditions. *Molec. Breed.* **5**, 121–130.

Tomenius, K., Clapham, D. and Meshi, T. (1987). Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* **160**, 363–371.

Tomita, K. and Rich, A. (1964). X-ray diffraction investigations of complementary RNA. *Nature (London)* **201**, 1160–1164.

Tomlinson, J.A. (1962). Control of lettuce mosaic by the use of healthy seed. *Plant Pathol.* **11**, 61–64.

Tomlinson, J.A. (1981). Chemotherapy of plant viruses and virus diseases. In: K.F. Harris and K. Maramorosch (eds) *Pathogens, Vectors and Plant Diseases: Approaches to Control*, pp. 23–44. Academic Press, New York.

Tomlinson, J.A. and Faithfull, E.M. (1979). Effects of fungicides and surfactants on the zoospores of *Olpidium brassicae*. *Ann. Appl. Biol.* **93**, 13–19.

Tomlinson, J.A. and Faithfull, E.M. (1984). Studies on the occurrence of tomato bushy stunt virus in English rivers. *Ann. Appl. Biol.* **104**, 485–495.

Tomlinson, J.A. and Walker, V.M. (1973). Further studies on seed transmission in the ecology of some aphid-transmitted viruses. *Ann. Appl. Biol.* **73**, 293–298.

Tomlinson, J.A. and Ward, C. M. (1982). Selection for immunity in swede (*Briassica napus*) to infection by turnip mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* **101**, 43–50.

Tomlinson, J.A., Carter, A.L., Dale, W.T. and Simpson, C.J. (1970). Weed plants as sources of cucumber mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* **66**, 11–16.

Tomlinson, J.A., Faithfull, E.M. and Ward, C.M. (1976). Chemical suppression of the symptoms of two virus diseases. *Ann. Appl. Biol.* **84**, 31–41.

Tomlinson, J.A., Faithfull, E., Flemett, T.H. and Beards, G. (1982). Isolation of infective tomato barley stunt virus after passage through the human alimentary tract. *Nature (Lond.)* **300**, 637–638.

Tommiska, T.J., Hamalainen, J.H., Watanabe, K.N. and Valkonen, J.P.T. (1998). Mapping of the gene *Nx(phu)* that controls hypersensitivity resistance to potato virus X in *Solanum phureja* IvP35. *Theor. Appl. Genet.* **96**, 840–843.

Torbet, J. (1983). Internal structural anisotropy of spherical viruses studied with magnetic birefringence. *EMBO J.* **2**, 63–66.

Torbet, J., Timmins, P.A. and Lvov, Y. (1986). Packaging of DNA in cauliflower mosaic virus and bacteriophage Sd studied with magnetic birefringence. *Virology* **155**, 721–725.

Toriyama, S. (1986a). An RNA-dependent RNA polymerase associated with the filamentous nucleoproteins of rice stripe virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 1247–1255.

Toriyama, S. (1986b). Rice stripe virus: prototype of a new group of viruses that replicate in plants and insects. *Microbiol. Sci.* **3**, 347–351.

Toriyama, S. and Peters, D. (1981). Differentiation between broccoli necrotic yellows virus and lettuce necrotic yellows virus by their transcriptase activities. *J. Gen. Virol.* **56**, 59–66.

Torrance, L. (1980). Use of protein A to improve sensitisation of latex particles with antibodies to plant viruses. *Ann. Appl. Biol.* **96**, 45–50.

Torrance, L. (1987). Use of enzyme amplification in an ELISA to increase sensitivity of detection of barley yellow dwarf virus in oats and in individual vector aphids. *J. Virol. Methods* **15**, 131–138.

Torrance, L. (1999). Pomoviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1361–1364. Academic Press, San Diego.

Torrance, L. (2000). Genus *Furovirus*. In: van Regenmortel *et al.* (eds) *Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, pp. 904–908. Academic Press, San Diego.

Torrance, L. and Dolby, C.A. (1984). Sampling conditions for reliable routine detection by enzymelinked immunosorbent assay of three ilarviruses in fruit trees. *Ann. Appl. Biol.* **104**, 267–276.

Torrance, L. and Jones, R.A.C. (1982). Increased sensitivity of detection of plant viruses obtained by using a fluorogenic substrate in enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Appl. Biol.* **101**, 501–509.

Torrance, L., Larkins, A.P. and Butcher, G.W. (1986a). Characterisation of monoclonal antibodies against potato virus X and comparison of serotypes with resistance groups. *J. Gen. Virol.* **67**, 57–67.

Torrance, L., Pead, M.T., Larkins, A.P. and Butcher, G.W. (1986b). Characterisation of monoclonal antibodies to a UK isolate of barley yellow dwarf virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 549–556.

Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Herrera-Estrella, L. and Rivera-Bustamante, R.F. (1993). Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *J. Gen. Virol.* **74**, 2225–2231.

Torrigiani, P., Rabiti, A.L., Betti, L. *et al.* (1995). Improved method for polyamine determination in TMV, a rod-shaped virus. *J. Virol. Meth.* **53**, 157–163.

Toruella, M., Gordon, K. and Hohn, T. (1989). Cauliflower mosaic virus produces an aspartic proteinase to cleave its polyproteins. *EMBO J.* **8**, 2819–2825.

Toryama, S., Kimishima, T., Takahashi, M., Shumizu, T., Minaki, N. and Akutsu, K. (1998). The complete nucleotide sequence of rice grassy stunt virus genome and genomic comparisons with viruses of the genus Tenuivirus. *J. Gen. Virol.* **79**, 2051–2058.

Toth, R.L., Harper, K., Mayo, M.A. and Torrance, L. (1999). Fusion proteins of single-chain variable fragments derived from phage display libraries are effective reagents for routine diagnosis of potato leafroll virus infection in potato. *Phytopathology* **89**, 1015–1021.

Toussaint, A., Dekegel, D. and Vanheule, G. (1984). Distribution of *Odontoglossum* ringspot virus in apical meristems of infected *Cymbidium* cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* **25**, 297–305.

Toussaint, A., Kummert, J., Maroquin, C., Lebrun, A. and Roggemans, J. (1993). Use of virazole to eradicate odontoglossu, ringspot virus from *in vitro* cultures of Cymbidium Sw. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **32**, 303–309.

Toyoda, H., Oishi, Y., Matsuda, Y., Chatani, K. and Hirai, T. (1985). Resistance mechanism of cultured plant cells to tobacco mosaic virus. IV. Changes in tobacco mosaic virus concentrations in somaclonal tobacco callus tissues and production of virus-free plantlets. *Phytopathol. Z.* **114**, 126–133.

Traynor, P. and Ahlquist, P. (1990). Use of bromovirus RNA2 hybrids to map *cis*- and *trans*-acting functions in a conserved RNA replication gene. *J. Virol.* **64**, 69–77.

Traynor, P., Young, B.M. and Ahlquist, P. (1991). Deletion analysis of brome mosaic virus 2a protein: effects on RNA replication and systemic spread. *J. Virol.* **65**, 2807–2815.

Tremaine, J.H., Ronald, W.P. and Valcic, A. (1976). Aggregation properties of carnation ringspot virus. *Phytopathology* **66**, 34–39.

Trevathan, L.E., Tolin, S.A., Moore, L.D. and Orcutt, D.M. (1982). Total lipid, free sterol, free fatty acid, and triacylglycerol fatty acid content of tobacco mosaic virus-infected tobacco. *Can. J. Plant Sci.* **62**, 771–776.

Trudgill, D.L., Brown, D.J.F and McNamara, D.G. (1983). Methods and criteria for assessing the transmission of plant viruses by longidorid nematodes. *Rev. Nematol.* **6**, 133–141.

Truve, E., Aaspällu, A., Honkanen, J. *et al.* (1993). Transgenic potato plants expressing mammalian 2'-5' oligoadenylate synthetase are protected from potato virus X infection under field conditions. *Biotechnology* **11**, 1048–1052.

Tsagris, M., Tabler, M. and Sänger, H.L. (1987a). Oligomeric potato spindle tuber viroid (PSTV) RNA does not process autocatalytically under conditions where other RNAs do. *Virology* **157**, 227–231.

Tsagris, M., Tabler, M., Mühlbach, H.-P. and Sänger, H.L. (1987b). Linear oligomeric potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs are accurately processed *in vitro* to the monomeric circular viroid proper when incubated with a nuclear extract from healthy potato cells. *EMBO J.* **6**, 2173–2183.

Tsai, M.-S., Hsu, Y.-H. and Lin, N.-S. (1999). Bamboo mosaic potexvirus satellite RNA (satBaMV RNA)-encoded P20 protein preferentially binds to satBaMV RNA. *J. Virol.* **73**, 3032–3039.

Tsugita, A. and Fraenkel-Conrat, H. (1960). The amino acid composition and C-terminal sequence of a chemically evoked mutant of tobacco mosaic virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **46**, 636–642.

Tsugita, A., Gish, D.T., Young, J., Fraenkel-Conrat, H., Knight, C.A. and Stanley, W.M. (1960). The complete amino acid sequence of the protein of tobacco mosaic virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **46**, 1463–1469.

Tu, J.C. (1973). Electron microscopy of soybean root nodules infected with soybean mosaic virus. *Phytopathology* **63**, 1011–1017.

Tu, J.C. (1977). Effects of soybean mosaic virus infection on ultrastucture of bacteroidal cells in soybean root nodules. *Phytopathology* **67**, 199–205.

Tu, J.C. (1997). Effect on necrotic and non-necrotic strains of bean common mosaic and bean yellow mosaic viruses on nodulation and root tip necrosis of bean (*Phaseolus vulgaris*). *Can. J. Phytopathol.* **19**, 156–160.

Tu, J.C. and Buzzell, R.I. (1987). Stem-tip necrosis: a hypersensitive, temperature dependent dominant gene reaction of soybean to infection by soybean mosaic virus. *Can. J. Plant Sci.* **67**, 661–665.

Tu, J.C., Ford, R.E. and Quiniones, S.S. (1970). Effects of soybean mosaic virus and/or bean pod mottle virus infection on soybean modulation. *Phytopathology* **60**, 518–523.

Tumer, N.E., Hwang, D.-J. and Bonness, M. (1997). C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 3866–3871.

Tumer, N.E., Hudak, K., Di, R., Coetzer, C., Wang, P. and Zoubenko, O. (1999). Pokeweed antiviral protein and its applications. *Curr. Top. Microbiol.* **240**, 139–158.

Turgeon, R., Beebe, D.U. and Gowan, E. (1993). The intermediary cell: minor-vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in the *Scrophulariaceae*. *Planta* **191**, 446–456.

Turina, M., Maruoka, M., Monis, J., Jackson, A.O. and Scholthof, K.B.G. (1998). Nucleotide sequence and infectivity of full-length cDNA clone of Panicum mosaic virus. *Virology* **241**, 141–155.

Turnbull-Ross, A.D., Mayo, M.A., Reavy, B. and Murant, A.F. (1993). Sequence analysis of the parsnip yellow fleck polyprotein: evidence for affinities with picornaviruses. *J. Gen. Virol.* **74**, 555–561.

Turner, D.R. and Butler, P.J.G. (1986). Essential features of the assembly origin of tobacco mosaic virus RNA as studied by directed mutagenesis. *Nucl. Acids Res.* **14**, 9229–9242.

Turner, D.R., Mondragon, A., Fairall, L., Bloomer, A.C., Finch, J.T., van Boom, J.H. and Butler, P.J.G. (1986). Oligonucleotide binding to the coat protein disk of tobacco mosaic virus: possible steps in the assembly mechanism. *Eur. J. Biochem.* **157**, 269–274.

Turner, D.R., Joyce, L.E. and Butler, P.J.G. (1988). The tobacco mosaic virus assembly origin RNA: functional characteristics defined by directed mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **203**, 531–547.

Turner, D.R., McGuigan, C.J. and Butler, P.J.G. (1989). Assembly of hybrid RNAs with tobacco mosaic virus coat protein: evidence for incorporation of disks in 5′ elongation along the major RNA tail. *J. Mol. Biol.* **209**, 407–422.

Turner, D.S. and Covey, S.N. (1984). A putative primer for the replication of cauliflower mosaic virus by reverse transcription is virion-associated. *FEBS Lett.* **165**, 285–289.

Turner, D.S. and Covey, S.N. (1988). Discontinuous hairpin DNAs synthesized *in vivo* following specific and non-specific priming of cauliflower mosaic virus DNA (+) strands. *Virus Res.* **9**, 49–62.

Turner, N.E., O'Connell, K.M., Nelson, R.S. *et al.* (1987a). Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO J.* **6**, 1181–1188.

Turner, Ph.C., Watkins, P.A.C., Zaitlin, M. and Wilson, T.M.A. (1987b). Tobacco mosaic virus particles uncoat and express their RNA in *Xenopus laevis* oocytes: implications for early interactions between plant cells and viruses. *Virology* **160**, 515–517.

Turpen, T.H., Turpen, A.M., Weinzettl, N., Kumagai, M.H. and Dawson, W.O. (1993). Transfection of whole plants from would inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of tobacco mosaic virus. *J. Virol. Methods* **42**, 227–240.

Turpen, T.H., Reini, S.J., Charoenvit, Y., Hoffman, S.L., Fallarme, V. and Grill, L.J. (1995). Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Bio/Technology* **13**, 53–57.

Twomey, T.A. and Krawetz, S.A. (1990). Parameters affecting hybridization of nucleic acids blotted onto nylon or nitrocellulose membranes. *BioTechniques* **8**, 478–482.

Tzafrir, I., Torbert, K.A., Lockhart, B.E.M., Somers, D.A. and Olszewski, N.E. (1998). The sugarcane bacilliform badnavirus promoter is active in both monocots and dicots. *Plant Mol. Biol.* **38**, 347–356.

Uchino, H., Kanzawa, K. and Tamada, T. (1993). Effect of fluazinam on infections of sugar beets by *Polymyxa betae,* vector of beet necrotic yellow vein virus. In: C. Hiruki (ed.) *Proceedings of the Second Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, pp. 153–156. American Society of Sugar Beet Technologists, Denver, CO.

Uegaki, R., Kobe, S. and Fujimori, T. (1988). Stress compounds in the leaves of *Nicotiana undulata* induced by TMV inoculation. *Phytochemistry* **27**, 365–368.

Ugaki, M., Ueda, T., Timmermans, M.C.P., Vieira, J., Elliston, K.O. and Messing, J. (1991). Replication of a geminivirus derived shuttle vector in maize endosperm cells. *Nucl. Acids Res.* **19**, 371–377.

Uhde, K., Kerschbaumer, R.J., Koenig, R. *et al.* (2000). Improved detection of beet necrotic yellow vein virus in DAS ELISA by means of antibody single chain fragments (scFv) which were selected to protease-stable epitopes from phage display libraries. *Arch. Virol.* **145**, 179–185.

Ukai, Y. and Yamashita, A. (1984). Induced mutation for resistance to barley yellow mosaic virus. *Jpn Agric. Res. Quart.* **17**, 255–259.

Ullman, D.E., Qualset, C.O. and McLean, D.L. (1988). Feeding responses of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphidae) to barley yellow dwarf virus resistant and susceptible barley varieties. *Environ. Entomol.* **17**, 988–991.

Ullman, D.E., Westcot, D.M., Hunter, W.B. and Mau, R.F.L. (1989). Internal anatomy and morphology of *Frankliniella iccidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) with special reference to interactions between thrips and tomato spotted wilt virus. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **18**, 289–310.

Ullman, D.E., Sherwood, J.L. and German, T.L (1997). Thrips as vectors of plant pathogens. In: T. Lewis (ed.) *Thrips as Crop Pests*, pp. 539–565. CAB International, Wallingford, UK.

Umaharan, P., Padidam, M., Phelps, R.H., Beachy, R.N. and Fauquet, C.M. (1998). Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology* **88**, 1262–1268.

Unge, T., Montelius, I., Liljàs, L. and Ofverstedt, L.-G. (1986). The EDTA-treated expanded satellite tobacco necrosis virus: biochemical properties and crystallisation. *Virology* **152**, 207–218.

Unseld, S., Ringel, M., Konrad, A., Lauster, S. and Frischmuth, T. (2000). Virus-specific adaptations for the production of a pseudorecombinants virus formed by two distinct bipartite geminiviruses from Central America. *Virology* **274**, 179–188.

Uppal, B.N. (1934). The movement of tobacco mosaic virus in leaves of *Nicotiana sylvestris*. *Indian J. Agric. Sci.* **4**, 865–873.

Urban, C. and Beier, H. (1995). Cysteine tRNAs of plant origin as novel UGA suppressors. *Nucl. Acids Res.* **23**, 4591–4597.

Urban, L.A., Ramsdell, D.C., Klomparens, K.L., Lynch, T. and Hancock, J.F. (1989). Detection of blueberry shoestring virus in xylem and phloem tissues of highbush blueberry. *Phytopathology* **79**, 488–493.

Urban, L.A., Sherwood, J.L., Rezende, J.A.M. and Melcher, U. (1990). Examination of mechanisms of cross protection in non-transgenic plants. In: R.S.S. Fraser (ed.) *Recognition and Response in Plant–Virus Interactions*, pp. 415–426. Springer, Berlin.

Urcuqui-Inchima, S., Maia, I.G., Arrunda, P., Haenni, A.-L. and Bernardi, F. (2000). Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology* **268**, 104–111.

Ushiyama, R. and Matthews, R.E.F. (1970). The significance of chloroplast abnormalities associated with infection by turnip yellow mosaic virus. *Virology* **42**, 293–303.

Uyeda, I., Lee, S.Y., Yoshimoto, H. and Shikata, E. (1987). RNA polymerase activity of rice ragged stunt and rice black-streaked dwarf viruses. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* **53**, 60–62.

Uyeda, I., Kudo, H., Takahashi, T., Sano, T., Oshima, K., Matsumura, T. and Shikata, E. (1989). Nucleotide sequence of rice dwarf virus genome segment 9. *J. Gen. Virol.* **70**, 1297–1300.

Uyeda, I., Kimura, I. and Shikata, E. (1995). Characterization of genome structure and establishment of vector cell lines for plant reoviruses. *Adv. Virus Res.* **45**, 249–279.

Uyemoto, J.K. and Gilmer, R.M. (1972). Properties of tobacco necrosis virus strains isolated from apple. *Phytopathology* **62**, 478–481.

Uyemoto, J.K., Grogan, R.G. and Wakeman, J.R. (1968). Selective activation of satellite virus strains by strains of tobacco necrosis virus. *Virology* **34**, 410–418.

Vaden, V.R. and Melcher, U. (1990). Recombination sites in cauliflower mosaic virus DNAs: implication for mechanisms of recombination. *Virology* **177**, 717–726.

Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H. *et al.* (1987). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature (Lond.)* **328**, 33–37.

Vaewhongs, A.A. and Lommel, S.A. (1995). Virion formation is required for the long-distance movement of red clover necrotic mosaic virus in movement protein transgenic plants. *Virology* **212**, 607-613.

Valdez, R.B. (1972). A micro-container technique for studying virus transmission by nematodes. *Plant Pathol.* **21**, 114–117.

Valle, R.P.C., Drugeon, G., Devignes-Morch, M.D., Legocki, A.B. and Haenni, A.-L. (1992). Codon context effects in virus translational readthrough: a study *in vitro* of the determinants of TMV and MoMuLV amber suppression. *FEBS Lett.* **306**, 133–139.

Valleau, W.D. (1946). Breeding tobacco varieties resistant to mosaic. *Phytopathology* **36**, 412.

Valleau, W.D. (1952). Breeding tobacco for disease resistance. *Econ. Bot.* **6**, 69–102.

Valverde, R.A. and Dodds, J.A. (1986). Evidence for a satellite RNA associated naturally with the U5 strain and experimentally with the U1 strain of tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 1875–1884.

Valverde, R.A. and Dodds, J.A. (1987). Some properties of isometric virus particles which contain the satellite RNA of tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **68**, 965–972.

Valverde, R.A., Dodds, J.A. and Heick, J.A. (1986). Double-stranded fibonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathology* **76**, 459–465.

van Beek, N.A.M., Lohuis, D., Dijkstra, J. and Peters, D. (1985). Morphogenesis of Festuca leaf streak virus in cowpea protoplasts. *J. Gen. Virol.* **66**, 2485–2489.

van Bel, A.J.E and Kempers, R. (1997). The pore/plasmadesma unit: key element in the interplay between sieve element and companion cell. *Prog. Bot.* **58**, 278–291.

van Belkum, A., Abrahams, J.P., Pleij, C.W.A. and Bosch, L. (1985). Five pseudoknots at the 204 nucleotide long 3′ noncoding region of tobacco mosaic virus RNA. *Nucl. Acids Res.* **13**, 7673–7686.

van Belkum, A., Cornelissen, B., Linthorst, H., Bol, J., Pleij, C. and Bosch, L. (1987). tRNA-like properties of tobacco rattle virus RNA. *Nucleic Acids Res.* **15**, 2837–2850.

van Beynum, G.M.A., de Graaf, J.M., Castel, A., Kraal, B. and Bosch, L. (1977). Structural studies on the coat protein of alfalfa mosaic virus. *Eur. J. Biochem.* **72**, 63–78.

van Blokland, R., van der Geest, N., Mol, J.N.M. and Kooter, J.M. (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J.* **6**, 861–877.

van Bokhoven, H., van Lent, J.W.M., Custers, R., Vlak, J.M., Wellink, J. and van Kammen, A. (1992). Synthesis of the complete 200K polyprotein encoded by cowpea mosaic virus B-RNA in insect cells. *J. Gen. Virol.* **73**, 2775–2784.

van Bokhoven, H., le Gall, O., Kasteel, D., Verver, J., Wellink, J. and van Kammen, A. (1993a). *Cis-* and *trans*-acting elements in cowpea mosaic virus RNA replication. *Virology* **195**, 377–386.

van Bokhoven, H., Verver, J., Wellink, J. and van Kammen, A. (1993b). Protoplasts transiently expressing the 200K coding sequence of cowpea mosaic virus B-RNA support replication of M-RNA. *J. Gen. Virol.* **74**, 2233–2241.

van Boxtel, J., Singh, B.B., Thottappilly, G. and Maule, A.J. (2000). Resistance of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) breeding lines to blackeye cowpea mosaic and cowpea aphid-borne potyvirus isolates under experimental conditions. *J. Plant Dis. Protect.* **107**, 197–204.

van de Wetering, F., Goldbach, R. and Peters, D. (1996). Tomato spotted wilt tospovirus ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathology* **86**, 900–905.

van de Wetering, F., van der Hoek, M., Goldbach, R. and Peters, D. (1999). Differences in tomato spotted wilt virus vector competency between males and females of *Frankliniella occidentalis*. *Ent. Exp. Appl.* **93**, 105–112.

van den Heuvel, J.F.J.M. (1999). Fate of a luteovirus in the haemolymph of an aphid. In: H.G. Smith and H. Barker (eds) *The Luteoviridae*, pp. 112–119. CAB International, Wallingford, UK.

van den Heuvel, J.F.J.M., Verbeek, M. and van der Wilk, F. (1994). Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J. Gen. Virol.* **75**, 2559–2565.

van den Heuvel, J.F.J.M., Bruyere, A., Hogenhaut, S.A. *et al.* (1997). The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to *Buchneria* GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J. Virol.* **71**, 7258–7265.

van den Heuvel, J.F.J.M., Hogenhout, S.A. and van der Wilk, F. (1999). Recognition and receptors in virus transmission by arthropods. *Trends Microbiol.* **7**, 71–76.

van der Krol, A.R., Lenting, P.E., Veenstra, J. *et al.* (1988). An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature (Lond.)* **333**, 866–869.

van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N.M. and Stuitje, A.R. (1990). Flavenoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**, 291–299.

van der Kuyl, A.C., Langereis, K., Houwing, C.J., Jaspars, E.M.J. and Bol, J.F. (1990). *Cis*-acting elements involved in replication of alfalfa mosaic virus RNAs *in vitro*. *Virology* **176**, 346–354.

van der Lubbe, J.L.M., Hatta, T. and Francki, R.I.B. (1979). Structure of the antigen from Fiji disease virus particles eliciting antibodies specific to double-stranded polyribonucleotides. *Virology* **95**, 405–414.

van der Meer, J., Dorssers, L., van Kammen, A. and Zabel, P. (1984). The RNA-dependent RNA polymerase of cowpea is not involved in cowpea mosaic virus RNA replication: Immunological evidence. *Virology* **132**, 413–425.

van der Plank, J.E. (1946). A method for estimating the number of random groups of adjacent diseased plants in a homogeneous field. *Trans. R. Soc. S. Afr.* **31**, 269–278.

van der Plank, J.E. (1948). The relation between the size of fields and the spread of plant disease into them. Part I. Crowd diseases. *Emp. J. Exp. Agric.* **16**, 134–142.

van der Vlugt, R., Allefs, S., de Haan, P. and Goldbach, R. (1989). Nucleotide sequence of the 3′-terminal region of potato virus YN RNA. *J. Gen. Virol.* **70**, 229–233.

van der Vlugt, R.A.A., Ruiter, R.K. and Goldbach, R. (1992). Evidence for sense RNA-mediated resistance to PVT^N in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol. Biol.* **20**, 631–639.

van der Vossen, E.A.G., Notenboom, T. and Bol, J.F. (1995). Characterization of sequences controlling the synthesis of alfalfa mosaic virus subgenomic RNA *in vivo*. *Virology* **212**, 663–672.

van der Want, J.P.H., Boerjan, M.L. and Peters, D. (1975). Variability of some plant species from different origins and their suitability for virus work. *Neth.J. Plant Pathol.* **81**, 205–216.

van der Wel, N.N. (2000). Interaction between the alfalfa mosaic virus movement protein and plasmodesmata. PhD thesis, University of Wageningen, Netherlands.

van der Wel, N.N., Goldbach, R.W. and van Lent, J.W.M. (1998). The movement protein and coat protein of alfalfa mosaic virus accumulates in structurally modified plasmodesmata. *Virology* **244**, 322–329.

van der Wilk, F., Korsman, M. and Zoon, F. (1994). Detection of tobacco rattle virus in nematodes by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Eur. J. Plant Pathol.* **100**, 109–122.

van der Wilk, F., Verbeek, M., Dullemans, A.M. and van den Heuvel, J.F.J.M. (1997). Genome-linked protein of potato leafroll virus is located downstream of the putative protease domain of the ORF1 product. *Virology* **234**, 300–303.

van der Wilk, F., Verbeek, M., Dullemans, A. and van den Heuvel, J. (1998). The genome-linked protein (VPg) of southern bean mosaic virus is encoded by the ORF2. *Virus Genes* **17**, 21–24.

van Dijk, P., van der Meer, F.A. and Piron, P.G.M. (1987). Accessions of Australian *Nicotiniana* species suitable as indicator hosts in the diagnosis of palnt virus diseases. *Neth. J. Plant Pathol.* **93**, 73–85.

van Dun, C.M.P., Bol, J.F. and van Vloten-Doting, L. (1987). Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle virus coat protein genes in transgenic tobacco plants. *Virology* **159**, 299–305.

van Dun, C.M.P., van Vloten-Doting, L. and Bol, J.F. (1988a). Expression of alfalfa mosaic virus cDNAs 1 and 2 in transgenic tobacco plants. *Virology* **163**, 572–578.

van Dun, C.M.P., Overduin, B., van Vloten-Doting, L. and Bol, J.F. (1988b). Transgenic tobacco expressing tobacco streak virus or mutated alfalfa mosaic virus coat protein does not cross-protect against alfalfa mosaic virus infection. *Virology* **164**, 383–389.

van Emmelo, J., Ameloot, P., Plaetinck, G. and Fiers, W. (1984). Controlled synthesis of the coat protein of satellite tobacco necrosis virus in *Escherichia coli*. *Virology* **136**, 32–40.

van Etten, J.L. (1999). Algal viruses (*Phycodnaviridae*). In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 44–50. Academic Press, San Diego.

van Etten, J.L. and Meints, R.H. (1999). Giant viruses infecting algae. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 447–494.

van Etten, J.L., Burbank, D.E., Kuczmarski, D. and Meints, R.H. (1983). Virus infection of culturable *Chlorella*-like algae and development of a plaque assay. *Science* **219**, 994–996.

van Etten, J.L., Schuster, A.M. and Meints, R.H. (1988). Viruses of eukaryotic *Chlorella*-like alga. In: Y. Koltin and M.J. Leibowitz (eds) *Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes*, pp. 411–428. Dekker, New York.

van Griensven, L.J.L.D., van Kammen, A. and Rezelman, G. (1973). Characterization of the double-stranded RNA isolated from cowpea mosaic virus-infected *Vigna* leaves. *J. Gen. Virol.* **18**, 359–367.

van Hoof, H.A. (1970). Some observations on retention of tobacco rattle virus in nematodes. *Neth. J. Plant Pathol.* **76**, 329–330.

van Hoof, H.A. (1976). The bait leaf method for determining soil infestation with tobacco rattle virus-transmitting trichodorids. *Neth. J. Plant Pathol.* **82**, 181–185.

van Hoof, H.A. (1977). Determination of the infection pressure of potato virus YN. *Neth. J. Plant Pathol.* **83**, 123–127.

van Hoof, H.A. and Silver, C.N. (1976). Natural elimination of tobacco rattle virus in tulip 'Apeldoorn'. *Neth. J. Plant Pathol.* **82**, 255–256.

van Kammen, A. (1968). The relationship between the components of cowpea mosaic virus: I. Two ribonucleoprotein particles necessary for the infectivity of CPMV. *Virology* **34**, 312–318.

van Kammen, A. (1999). Beijerinck's contribution to the virus concept—an introduction. In: C.H. Calisher and M.C. Horzinek (eds) *100 Years of Virology*. *Arch. Virol.* **15** (Suppl.), 1–8.

van Kammen, A. and Eggen, H.I.L. (1986). The replication of cowpea mosaic virus. *BioEssays* **5**, 261–266.

van Kan, J.A.L., Cornelissen, B.J.C. and Bol, J.F. (1988). A virus-inducible tobacco gene encoding a glycine-rich protein shares putative regulatory elements with the ribulose bisphosphate carboxylase small subunit gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* **1**, 107–112.

van Kooten, O., Meurs, C. and van Loon, L.C. (1990). Photosynthetic electron transport in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant.* **80**, 446–452.

van Lent, J., Storms, M., van der Meer, F., Wellink, J. and Goldbach, R. (1991). Tubular structures involved in the movement of cowpea mosaic virus are also formed in infected cowpea protoplasts. *J. Gen. Virol.* **72**, 2615–2623.

van Lent, J.W.M. and Verduin, B.J.M. (1985). Specific gold-labelling of antibodies bound to plant viruses in mixed suspensions. *Neth. J. Plant Pathol.* **91**, 205–213.

van Lent, J.W.M. and Verduin, B.J.M. (1986). Detection of viral protein and particles in thin sections of infected plant tissue using immunogold labelling. In: R.A.C. Jones and L. Torrance (eds) *Developments and Applications in Virus Testing*, Dev. Appl. Biol. 1, pp. 193–211. Association of Applied Biologists, Wellesbourne.

van Lent, J.W.M. and Verduin, B.J.M. (1987). Detection of viral antigen in semi-thin sections of plant tissue by immunogold–silver staining and light microscopy. *Neth. J. Plant Pathol.* **93**, 261–272.

van Loon, L.C. (1977). Induction by 2-chloroethylphosphonic acid of viral-like lesions, associated proteins and systemic resistance in tobacco. *Virology* **88**, 417–420.

van Loon, L.C. (1989). Stress proteins in infected plants. In: T. Kosuge and E.W. Nester (eds) *Plant–Microbe Interactions*, pp. 198–237. McGraw-Hill, New York.

van Loon, L.C. and Dijkstra, J. (1976). Virus-specific expression of systemic acquired resistance in tobacco mosaic virus- and tobacco necrosis virus-infected 'Samsun NN' and 'Samsun' tobacco. *Neth. J. Plant Pathol.* **82**, 231–237.

van Loon, L.C. and van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**, 199–211.

van Loon, L.C. and van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**, 85–97.

van Oosten, H.J., Meijneke, C.A.R. and Peerbooms, H. (1983). Growth, yield and fruit quality of virus-infected and virus-free Golden Delicious apple trees 1968–1982. *Acta Hortic.* **130**, 213–217.

van Pelt-Heerschap, H., Verbeek, H., Slot, J.W. and van Vloten-Doting, L. (1987a). The location of coat protein and viral RNAs of alfalfa mosaic virus in infected tobacco leaves and protoplasts. *Virology* **160**, 297–300.

van Pelt-Heerschap, H., Verbeek, H., Huisman, M.J., Loesch-Fries, L.S. and van Vloten-Doting, L. (1987b). Non-structural proteins and RNAs of alfalfa mosaic virus synthesized in tobacco and cowpea protoplasts. *Virology* **161**, 190–197.

van Poelwijk, F., Kolkman, J. and Goldbach, R. (1996). Sequence analysis of the 5′ ends of tomato spotted wilt virus N mRNAs. *Arch. Virol.* **141**, 177–184.

van Regenmortel, M.H.V. (1975). Antigenic relationships between strains of tobacco mosaic virus. *Virology* **64**, 415–420.

van Regenmortel, M.H.V. (1982). *Serology and Immunochemistry of Plant Viruses*. Academic Press, New York.

van Regenmortel, M.H.V. (1984a). Recent advances in immunodiagnosis of viral diseases of crops. In: E. Kursak (ed.) *Applied Virology*, pp. 463–477. Academic Press, New York.

van Regenmortel, M.H.V. (1984b). Molecular dissection of antigens by monoclonal antibodies. In: N.J. Stern and H.R. Gamble (eds) *Hybridoma Technology in Agricultural and Veterinary Research*, pp. 43–82. Rowman and Allanheld, Totowa, NJ.

van Regenmortel, M.H.V. (1984c). Monoclonal antibodies in plant virology. *Microbiol. Sci.* **1**, 73–78.

van Regenmortel, M.H.V. (1986). The potential for using monoclonal antibodies in the detection of plant viruses. In: R.A.C. Jones and L. Torrance (eds) *Developments and Applications in Virus Testing*, Dev. Appl. Biol. 1, pp. 89–101. Association of Applied Biologists, Wellsbourne.

van Regenmortel, M.H.V. (1989a). Applying the species concept to plant viruses. *Arch. Virol.* **104**, 1–17.

van Regenmortel, M.H.V. (1989b). Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity. *Immunol. Today* **10**, 266–272.

van Regenmortel, M.H.V. (1990). Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. *Intervirology* **31**, 241–254.

van Regenmortel, M.H.V. (1992). The conformational specificity of viral epitopes. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**, 483–488.

van Regenmortel, M.H.V. (1999). How to write the names of virus species. *Arch. Virol.* **144**, 1041–1042.

van Regenmortel, M.H.V. (2000). On the relative merits of italics, Latin and binomial nomenclature in virus taxonomy. *Arch. Virol.* **145**, 433–441.

van Regenmortel, M.H.V. and Dubs, M.-C. (1993). Serological procedures. In: R.E.F. Matthews (ed.) *Diagnosis of Plant Virus Diseases*, pp. 159–214. CRC Press, Boca Raton, FL.

van Regenmortel, M.H.V. and von Wechmar, M.B. (1970). A reexamination of the serological relationship between tobacco mosaic virus and cucumber virus 4. *Virology* **41**, 330–338.

van Regenmortel, M.H.V., Bishop, D.H.L., Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J. and Calisher, C.H. (1997). Guidelines to the demarcation of virus species. *Arch Virol.* **142**, 1505–1518.

van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L. *et al.* (eds) (2000). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, San Diego.

van Rossum, C.M.A., Brederode, F.Th., Neeleman, L. and Bol, J.F. (1997a). Functional equivalence of common and unique sequences in the 3′ terminal untranslated regions of alfalfa mosaic virus RNAs 1, 2 and 3. *J. Virol.* **71**, 3811–3816.

van Rossum, C.M.A., Reusken, C.B.E.M., Brederode, F.Th. and Bol, J.F. (1997b). The 3′ untranslated region of alfalfa mosaic virus RNA 3 contains a core promoter for minus-strand synthesis and an enhancer element. *J. Gen. Virol.* **78**, 3045–3049.

van Tol, R.G.L. and van Vloten-Doting, L. (1979). Translation of alfalfa-mosaic-virus RNA1 in the mRNA-dependent translation system from rabbit reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **93**, 461–468.

van Tol, R.G.L. and van Vloten-Doting, L. (1981). Lack of serological relationship between the 35K non-structural protein of alfalfa mosaic virus and the corresponding proteins of three other plant viruses with tripartite genomes. *Virology* **109**, 444–447.

van Tol, R.G.L., van Gemeren, R. and van Vloten-Doting, L. (1980). Two leaky termination codons in AMV RNA1. *FEBS Lett.* **118**, 67–71.

van Vloten-Doting, L. (1968). Verdeling van de genetische informatie over de natuurlijke componenten van een plantvirus. PhD Thesis, University of Leiden.

van Vloten-Doting, L. (1975). Coat protein is required for infectivity of tobacco streak virus: biological equivalence of the coat proteins of tobacco streak and alfalfa mosaic viruses. *Virology* **65**, 215–225.

van Vloten-Doting, L. (1976). Similarities and differences between viruses with a tripartite genome. *Ann. Microbiol. (Paris)* **127**, 119–129.

van Vloten-Doting, L. and Jaspars, E.M.J. (1972). The uncoating of alfalfa mosaic virus by its own RNA. *Virology* **48**, 699–708.

van Vloten-Doting, L. and Jaspars, E.M.J. (1977). Plant covirus systems: three-component systems. *Compr. Virol.* **11**, 1–53.

van Vloten-Doting, L., Kruseman, J. and Jaspars, E.M.J. (1968). The biological function and mutual dependence of bottom component and top component of alfalfa mosaic virus. *Virology* **34**, 728–737.

van Vloten-Doting, L., Hasrat, J.A., Oosterwijk, E., van't Sant, P., Schoen, M.A. and Roosien, J. (1980). Description and complementation analysis of 13 temperature-sensitive mutants of alfalfa mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **46**, 415–426.

van Vloten-Doting, L., Bol, J.F. and Cornelissen, B. (1985). Plant virus-based vectors for gene transfer will be of limited use because of the high error frequency during viral RNA synthesis. *Plant Mol. Biol.* **4**, 323–326.

van Wezenbeek, P., Verver, J., Harmsen, J., Vos, P. and van Kammen, A. (1983). Primary structure and gene organisation of the middle component RNA of cowpea mosaic virus. *EMBO J.* **2**, 941–946.

Vance, V.B. (1991). Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. *Virology* **182**, 486–494.

Vance, V.B. and Beachy, R.N. (1984). Detection of genomic-length soybean mosaic virus RNA on polyribosomes of infected soybean leaves. *Virology* **138**, 26–36.

Vance, V.B., Berger, P.H., Carrington, J.C., Hunt, A.G. and Shi, X.M. (1995). 5′ proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* **206**, 583–590.

Vanderveken, J.J. (1977). Oils and other inhibitors of nonpersistent virus transmission. In: K.F. Harris and K. Maramorosch (eds) *Aphids as Virus Vectors*, pp. 435–454. Academic Press, New York.

Varrelmann, M. and Maiss, E. (2000). Mutations in the coat protein gene of plum pox virus suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* **81**, 567–576.

Varveri, C. (2000). Potato Y potyvirus detection by immunological and molecular techniques in plants and aphids. *Phytoparasitica* **28**, 141–148.

Varveri, C., Candresse, T., Cugusi, M., Ravelonandro, M. and Dunez, J. (1988). Use of ^{32}P-labelled transcribed RNA probe for dot hybridization detection of plum pox virus. *Phytopathology* **78**, 1280–1283.

Vassilakos, N., MacFarlane, S.A., Welscher, B. and Brown, D.J.F. (1997). Exclusivity and complementarity in the association between nepo- and tobraviruses and their respective vector nematodes. *Mededl. Facult. Landbouwwetenschappen Univ. Gent* **62**, 713–720.

Vaucheret, H., Béclin, C., Elmayan, T. *et al.* (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.* **16**, 651–659.

Vawter, L. and Brown, W.M. (1986). Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science* **234**, 194–196.

Vela C., Cambra, M., Cortes, E. *et al.* (1986). Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnosis. *J. Gen. Virol.* **67**, 91–96.

Veldee, S. and Fraenkel-Conrat, H. (1962). The characterisation of tobacco mosaic virus strains by their productivity. *Virology* **18**, 56–63.

Venekamp, J.H. and Beemster, A.B.R. (1980). Mature plant resistance of potato against some virus diseases. I. Concurrence of development of mature plant resistance against potato virus X and decrease of ribosome and RNA content. *Neth. J. Plant Pathol.* **86**, 1–10.

Vera, A., Daròs, J.-A., Flores, R. and Hernández, C. (2000). The DNA of a plant retroviroid-like element is fused to different sites in the genome of a plant pararetrovirus and shows multiple forms with sequence deletions. *J. Virol.* **74**, 10390–10400.

Verchot, J., Angell, S.M. and Baulcombe, D. (1998). *In vivo* translation of the triple gene block of potato virus X requires two subgenomic RNAs. *J. Virol.* **72**, 8316–8320.

Vercruysse, P., Gibbs, M., Tirry, L. and Hofte, M. (2000). RT-PCR using redundant primers to detect three viruses associated with carrot motley dwarf disease. *J. Virol. Methods* **88**, 153–161.

Verdaguer, B., de Kochko, A., Beachy, R.N. and Fauquet, C. (1996). Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Mol. Biol.* **31**, 1129–1139.

Verdaguer, B., de Kocho, A., Fux, C.I., Beachy, R.N. and Fauquet, C. (1998). Functional organization of the cassava vein mosaic virus (CsVMV) promoter. *Plant Mol. Biol.* **37**, 1055–1067.

Verduin, B.J.M., Prescott, B. and Thomas, G.J. (1984). RNA-protein interactions and secondary structures of cowpea chlorotic mottle virus for *in vitro* assembly. *Biochemistry* **23**, 4301–4308.

Verhagen, W., van Boxsel, J.A.M., Bol, J.F., van Vloten-Doting, L. and Jaspars, E.M.J. (1976). RNA-protein interactions in alfalfa mosaic virus. *Ann. Microbiol. (Paris)* **127A**, 165–172.

Verma, H.N., Baranwal, V.K. and Srivastava, S. (1998). Breeding for resistance to plant viruses. In: A Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 154–162. APS Press, St. Paul, MN.

Vértesy, J. and Nyéki, J. (1974). Effect of different ringspot viruses on the flowering period and fruit set of Montmorency and Pándy sour cherries: I. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **9**, 17–22.

Verver, J., Goldbach, R., García, J.A. and Vos, P. (1987). *In vitro* expression of a full-length DNA copy of cowpea mosaic virus B-RNA: identification of the B-RNA encoded 24-kD protein as a viral protease. *EMBO J.* **6**, 549–554.

Verver, J., Le Gall, O., van Kammen, A. and Wellink, J. (1991). The sequence between nucleotides 161 and 512 of cowpea mosaic virus M RNA is able to support internal initiation of translation *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **72**, 2339–2345.

Verver, J., Wellink, J., van Lent, J., Gopinath, K. and van Kammen, A. (1998). Studies on the movement of cowpea mosaic virus using the jellyfish green fluorescent protein. *Virology* **242**, 22–27.

Vetten, H.J. and Allen, D.J. (1983). Effects of environment and host on vector biology and incidence of two whitefly-spread diseases of legumes in Nigeria. *Ann. Appl. Biol.* **102**, 219–227.

Vetten, H.J., Lesemann, D.-E. and Dalchow, J. (1987). Electron microscopical and serological detection of virus-like particles associated with lettuce big vein disease. *J. Phytopathol.* **120**, 53–59.

Villegas, L.C., Druka, A., Bajet, N.B. and Hull, R. (1997). Genetic variation of rice tungro bacilliform virus in the Philippines. *Virus Genes* **15**, 195–210.

Virudachalum, R., Harrington, M., Johnson, J.E. and Markley, J.L. (1985). ^{1}H, ^{13}C and ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of cowpea mosaic virus: detection and exchange of polyamines and dynamics of the RNA. *Virology* **141**, 43–50.

Visser, P.B. (2000). *Role of RNA 2-Encoded Proteins in Nematode-Transmission of Tobacco Rattle Virus*. PhD Thesis, University of Leiden, Netherlands.

Visser, P.B. and Bol, J.F. (1999). Nonstructural proteins of tobacco rattle virus which have a role in nematode transmission: expression pattern and interaction with viral coat protein. *J. Gen. Virol.* **80**, 3273–3280.

Visser, P.B., Brown, D.J.F., Brederode, F.T. and Bol, J.F. (1999a). Nematode transmission of tobacco rattle virus serves as a bottleneck to clear the population from defective interfering RNAs. *Virology* **263**, 155–165.

Visser, P.B., Mathis, A. and Linthorst, H.J.M. (1999b). Tobraviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 1784–1789. Academic Press, San Diego.

Visvader, J.E. and Symons, R.H. (1985). Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucl. Acids Res.* **13**, 2907–2920.

Visvader, J.E. and Symons, R.H. (1986). Replication of *in vitro* constructed viroid mutants: location of the pathogenicity-modulating domain of citrus exocortis viroid. *EMBO J.* **5**, 2051–2055.

Vogel, R.H. and Provencher, S.W. (1988). Three-dimensional reconstruction from electron micrographs of disordered specimens: II. Implementation and results. *Ultramicroscopy* **25**, 223–240.

Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**, 177–187.

Voinnet, O., Pinto, Y.M. and Baulcombe, D.C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 14147–14152.

Vos, P., Jaegle, M., Wellink, J. *et al.* (1988a). Infectious RNA transcripts derived from full-length DNA copies of the genomic RNAs of cowpea mosaic virus. *Virology* **164**, 33–41.

Vos, P., Verver, J., Jaegle, M., Wellink, J., van Kammen, A. and Goldbach, R. (1988b). Two viral proteins involved in the proteolytic processing of the cowpea mosaic virus polyproteins. *Nucl. Acids Res.* **16**, 1967–1985.

Vriend, G., Verduin, B.J.M. and Hemminga, M.A. (1986). Role of the N-terminal part of the coat protein in the assembly of cowpea chlorotic mottle virus: a 500 MHz proton nuclear magnetic resonance study and structural calculations. *J. Mol. Biol.* **191**, 453–460.

Wagih, E.E. and Coutts, R.H.A. (1982). Peroxidase, polyphenoloxidase and ribonuclease in tobacco necrosis virus infected or mannitol osmotically-stressed cowpea and cucumber tissue. I. Quantitative alterations. *Phytopathol. Z.* **104**, 1–12.

Wagner, G.W. and Bancroft, J.B. (1968). The self-assembly of spherical viruses with mixed coat proteins. *Virology* **34**, 748–756.

Wagner, J.D.O. and Jackson, A.O. (1997). Characterization of the components and activity of sonchus yellow net rhabdovirus polymerase. *J. Virol.* **71**, 2371–2382.

Wagner, J.D.O., Chol, T.-J. and Jackson, A.O. (1996). Extraction of nuclei from sonchus yellow net rhabdovirus-infected plants yields a polymerase that synthesizes viral mRNAs and polyadenylated plus-strand leader RNA. *J. Virol.* **70**, 468–477.

Wagner, W.H. (1984). A comparison of taxonomic methods in biosystematics. In: W.F. Grant (ed.) *Plant Biosystematics*, pp. 643–654. Academic Press, Orlando, FL.

Wah, Y.F.W.C. and Symons, R.H. (1999). Transmission of viroids via grape seeds. *J. Phytopathol.* **147**, 285–291.

Wahyuni, W.S. and Randles, J.W. (1993). Inoculation with root nodulating bacteria reduces the susceptibility of *Medicago truncatula* and *Lupinus angustifolius* to cucumber mosaic virus (CMV) and addition of nitrate partially reverses the effect. *Austr. J. Agric. Res.* **44**, 1917–1929.

Waigmann, E and Zambryski, P. (1995). Tobacco mosaic virus movement protein-mediated protein transport between trichome cells. *Plant Cell* **7**, 2069–2079.

Waigmann, E., Lucas, W.J., Citovsky, V. and Zambryski, P. (1994). Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmatal permability. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 1433–1437.

Waigmann, E., Turner, A., Peart, J., Roberts, K. and Zambryski, P. (1997). Ultrastructural analysis of leaf trichome plasmodesmata reveals major difference from mesophyll plasmodesmata. *Planta* **203**, 75–84.

Waigmann, E., Chen, M.-H., Bachmaier, R., Ghoshroy, S. and Citovsky, V. (2000). Regulation of plasmodesmatal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *EMBO J.* **19**, 4875–4884.

Wakarchuk, D.A. and Hamilton, R.I. (1985). Cellular double-stranded RNA in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Med. Biol.* **5**, 55–63.

Wakarchuk, D.A. and Hamilton, R.I. (1990). Partial nucleotide sequence from enigmatic dsRNAs in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol. Biol.* **14**, 637–639.

Walbot, V. (2000). Saturation mutagenesis using maize transposons. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 103–107.

Walden, R. and Howell, S.H. (1982). Intergenomic recombination events among pairs of defective cauliflower mosaic virus genomes in plants. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 447–456.

Walker, H.L. and Pirone, T.P. (1972a). Particle numbers associated with mechanical and aphid transmission of some plant viruses. *Phytopathology* **62**, 1283–1288.

Walker, H.L. and Pirone, T.P. (1972b). Number of TMV particles required to infect locally or systemically susceptible tobacco cultivars. *J. Gen. Virol.* **17**, 241–243.

Walkey, D.G.A. (1968). The production of virus-free rhubarb by apical tip-culture. *J. Hortic. Sci.* **43**, 283–287.

Walkey, D.G.A. (1985). *Applied Plant Virology*. Heinemann, London.

Walkey, D.G.A. (1991). *Applied Plant Virology*, 2nd edn. Chapman & Hall, London.

Walkey, D.G.A. and Antill, D.N. (1989). Agronomic evaluation of virus-free and virus-infected garlic (*Allium sativum* L). *J. Hortic. Sci.* **64**, 53–60.

Walkey, D.G.A. and Cooper, J. (1976). Heat inactivation of cucumber mosaic virus in cultured tissues of *Stellaria media*. *Ann. Appl. Biol.* **84**, 425–428.

Walkey, D.G.A. and Dance, M.C. (1979). The effect of oil sprays on aphid transmission of turnip mosaic, beet yellows, bean common mosaic and bean yellow mosaic viruses. *Plant Dis. Rep.* **63**, 877–881.

Walkey, D.G.A. and Freeman, G.H. (1977). Inactivation of cucumber mosaic virus in cultured tissues of *Nicotiana rustica* by diurnal alternating periods of high and low temperature. *Ann. Appl. Biol.* **87**, 375–382.

Walkey, D.G.A. and Webb, M.J.W. (1968). Virus in plant apical meristems. *J. Gen. Virol.* **3**, 311–313.

Walkey, D.G.A. and Whittingham-Jones, S.G. (1970). Seed transmission of strawberry latent ringspot virus in celery (*Apium graveolens* var. Dulce). *Plant Dis. Rep.* **54**, 802–803.

Walkey, D.G.A., Fitzpatrick, J. and Woolfitt, J.M.G. (1969). The inactivation of virus in cultured shoot tips of *Nicotiana rustica* L. *J. Gen. Virol.* **5**, 237–241.

Walkey, D.G.A., Brocklehurst, P.A. and Parker, J.E. (1985). Some physiological effects of two seed-transmitted viruses on flowering, seed production, and seed vigour in *Nicotiana* and *Chenopodium* plants. *New Phytol.* **99**, 117–128.

Walkey, D.G.A., Webb, M.J.W., Bolland, C.J. and Miller, A. (1987). Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*Allium ascalonicum* L.) by meristem tip culture. *J. Hortic. Sci.* **62**, 211–220.

Walkey, D.G.A., Lecoq, H., Collier, R. and Dobson, S. (1992). Studies on the control of zucchini yellow mosaic virus in courgettes by mild strain protection. *Plant Pathol.* **41**, 762–771.

Wallin, J.R. and Loonan, D.V. (1971). Low-level jet winds, aphid vectors, local weather and barley yellow dwarf virus outbreaks. *Phytopathology* **61**, 1068–1070.

Walsh, I.A. (1986). Virus diseases of oilseed rape and their control. *Br. Crop Prot. Conf. Pest Dis.* **7A-3**, 737–743.

Walsh, J.A. (1992). Resistant watercress. *Grower* **118**, 18–21.

Walsh, J.A. (1998). Chemical control of fungal vectors of plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 196–207. APS Press, St. Paul, MN.

Walsh, J.A. and Tomlinson, J.A. (1985). Viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Ann. Appl. Biol.* **107**, 485–495.

Wang, A., Carrier, K., Chisholm, J., Wieczorek, A., Huguenot, C. and Sanfaçon, H. (1999a). Proteolytic processing of tomato ringspot nepovirus 3C-like protease precursors: definition of the domains for the VPg, protease and putative RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **80**, 799–809.

Wang, D. and Maule, A.J. (1992). Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of pea seed-borne mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **73**, 1615–1620.

Wang, D. and Maule, A.J. (1994). A model for seed transmission of a plant virus: genetic and structural analysis of pea embryo invasion by pea seed-borne mosaic virus. *Plant Cell* **6**, 777–787.

Wang, D. and Maule, A.J. (1995). Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. Science **267**, 229–231.

Wang, D. and Maule, A.J. (1997). Contrasting patterns in the spread of two seed-borne viruses in pea embryos. *Plant J.* **11**, 1333–1340.

Wang, D., MacFarlane, S.A. and Maule, A.J. (1997a). Viral determinants of pea early browning seed transmission in pea. *Virology* **234**, 112–117.

Wang, H. and Simon, A.E. (2000). 3′-end stem-loops of the subviral RNAs associated with turnip crinkle virus are involved in symptom modulation and coat protein binding. *J. Virol.* **74**, 6528–6537.

Wang, H. and Stubbs, G. (1993). Molecular dynamics in refinement against fiber diffraction data. *Acta Crystallog. Sect. A.* **49**, 504–513.

Wang, H., Planchart, A. and Stubbs, G. (1998a). Caspar carboxylates: the structural basis of tobamovirus disassembly. *Biophys. J.* **74**, 633–638.

Wang, H.-L., Wang, Y., Giesman-Cookmeyer, D., Lommel, S.A. and Lucas, W.J. (1998b). Mutations in viral movement protein alter systemic infection and identify an intercellular barrier to entry into the phloem long-distance transport system. *Virology* **245**, 75–89.

Wang, J. and Simon, A.E. (1999). Symptom attenuation by a satellite RNA *in vivo* is dependent on reduced levels of virus coat protein. *Virology* **259**, 234–245.

Wang, J., Carpenter, C.D. and Simon, A.E. (1999b). Minimal sequence and structural requirements for a subgenomic RNA promoter for turnip crinkle virus. *Virology* **253**, 327–336.

Wang, J.L. and Simon, A.E. (1997). Analysis of the two subgenomic RNA promoters for turnip crinkle virus *in vivo* and *in vitro*. *Virology* **232**, 174–186.

Wang, J.L. and Simon, A.E. (1998). Analysis of the two subgenomic RNA promoters for turnip crinkle virus *in vivo* and *in vitro*. *Virology* **232**, 174–186.

Wang, M.-B. and Waterhouse, P.M. (2000). High-efficiency silencing of β-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Mol. Biol.* **43**, 67–82.

Wang, M.-B., Abbott, D.C. and Waterhouse, P.M. (2001a). A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Mol. Plant Pathol.* (in press).

Wang, M.-B., Abbott, D.C., Upadhyaya, N.M., Jacobsen, J.V. and Waterhouse, P.M. (2001b). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of an elite barley cultivar with virus resistance and reporter genes. *Aust. J. Plant Physiol.* (in press).

Wang, M.-B., Wesley, V., Finnegan, J., Smith, N. and Waterhouse, P.M. (2001c). Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. *RNA* **7**, 16–28.

Wang, M.C., Lin, J.J., Duran-Vila, N. and Semancik, J.S. (1986). Alteration in cell wall composition and structure in viroid-infected cells. *Physiol. Plant Pathol.* **28**, 107–124.

Wang, P. and Turner, N.E. (2000). Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Adv. Virus Res.* **55**, 325–355.

Wang, P., Zoubenko, O. and Turner, N.E. (1998c). Reduced toxicity and broad spectrum resistance to viral and fungal infection in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein II. *Plant Mol. Biol.* **38**, 957–964.

Wang, R.Y and Pirone, T.P. (1996). Mineral oil interferes with retention of tobacco etch potyvirus in the stylets of *Myzus persicae*. *Phytopathology* **86**, 820–823.

Wang, R.Y., Ammar, E.D., Thornbury, D.W., Lopez-Moya, J.J. and Pirone, T.P. (1996). Loss of potyvirus transmissibility and helper component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets. *J. Gen. Virol.* **77**, 861–867.

Wang, R.Y., Gergerich, R.C. and Kim, K.S. (1992). Noncirculative transmission of plant viruses by leaf-feeding beetles. *Phytopathology* **82**, 946–950.

Wang, R.Y., Gergerich, R.C. and Kim, K.S. (1994). Entry of ingested plant viruses into the hemocoel of the beetle vector *Diabrotica undecimpunctata howardi*. *Phytopathology* **84**, 147–153.

Wang, S and Miller, W.A. (1995). A sequence located 4.5 to 5 kilobases from the 5′ end of the barley yellow dwarf virus (PAV) genome strongly stimulates translation of uncapped mRNA. *J. Biol. Chem.* **270**, 13446–13452.

Wang, S., Guo, L., Allen, E. and Miller, W.A. (1999c). A potential mechanism for selective control of cap-independent translation by a viral RNA sequence in *cis* and in *trans*. *RNA* **5**, 726–738.

Wang, S.P., Browning, K.S. and Miller, W.A. (1997b). A viral sequence in the 3′ untranslated region mimics a 5′ cap in facilitating translation of uncapped mRNA. *EMBO J.* **18**, 4107–4116.

Wang, Y., Gaba, V., Wolf, D., Xia, X.-D., Zelcher, A. and Gal-on, A. (2000). Identification of a novel plant virus promoter using a potyvirus infectious clone. *Virus Genes* **20**, 11–17.

Wanitchakorn, R., Hafner, G.J., Harding, R.M. and Dale, J.L. (2000). Functional analysis of proteins encoded by banana bunchy top virus DNA-4 to -6. *J. Gen. Virol.* **81**, 299–306.

Ward, A., Etessami, P. and Stanley, J. (1988). Expression of a bacterial gene in plants mediated by infectious geminivirus DNA. *EMBO J.* **7**, 1583–1587.

Ward, C.M., Walkey, D.G.A. and Phelps, K. (1987). Storage of samples infected with lettuce or cucumber mosaic viruses prior to testing with ELISA. *Ann. Appl. Biol.* **110**, 89–95.

Ward, C.W., Weiller, G.F., Shukla, D.D. and Gibbs, A. (1995). Molecular systematics of the *Potyviridae*, the largest plant virus family. In: A.J. Gibbs, C.H. Calisher and F. García-Arenal (eds) *Molecular Basis for Virus Evolution*, pp. 477–500. Cambridge University Press, Cambridge.

Warmke, H.E. and Edwardson, J.R. (1966). Electron microscopy of crystalline inclusions of tobacco mosaic virus in leaf tissue. *Virology* **30**, 45–57.

Wassenegger, M., Heimes, S. and Sänger, H.L. (1994). An infectious viroid RNA replicon evolved from an *in vitro*-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion *in vivo*. *EMBO J.* **13**, 6172–6177.

Watanabe, T., Honda, A., Iwata, A., Ueda, S., Hibi, T. and Ishihama, A. (1999). Isolation from tobacco mosaic virus-infected tobacco of a solubilized template-specific RNA-dependent RNA polymerase containing a 126K/183K protein heterodimer. *J. Virol.* **73**, 2633–2640.

Watanabe, Y. and Okada, Y. (1986). *In vitro* viral RNA synthesis by a subcellular fraction of TMV-inoculated tobacco protoplasts. *Virology* **149**, 64–73.

Watanabe, Y., Ohno, T. and Okada, Y. (1982). Virus multiplication in tobacco protoplasts inoculated with tobacco mosaic virus RNA encapsulated in large unilamellar vesicle liposomes. *Virology* **120**, 478–480.

Watanabe, Y., Meshi, T. and Okada, Y. (1984a). The initiation site for transcription of the TMV 30-kDa protein messenger RNA. *FEBS Lett.* **173**, 247–250.

Watanabe, Y., Emori, Y., Ooshika, I., Meshi, T., Ohno, T. and Okada, Y. (1984b). Synthesis of TMV-specific RNAs and proteins at the early stage of infection in tobacco protoplasts: Transient expression of the 30k protein and its mRNA. *Virology* **133**, 18–24.

Watanabe, Y., Meshi, T. and Okada, Y. (1987a). Infection of tobacco protoplasts with *in vitro* transcribed tobacco mosaic virus RNA using an improved electroporation method. *FEBS Lett.* **219**, 65–69.

Watanabe, Y., Morita, N., Nishiguchi, M. and Okada, Y. (1987b). Attenuated strains of tobacco mosaic virus. Reduced synthesis of a viral protein with a cell-to-cell movement function. J. Mol. Biol. **194**, 699–704.

Watanabe, Y., Kishibayashi, N., Motoyoshi, F. and Akada, Y. (1987c). Characterization of *Tm-1* gene action on replication of common isolates and a resistance-breaking isolate of TMV. *Virology* **161**, 527–532.

Watanabe, Y., Ogawa, T. and Okada, Y. (1992). *In vivo* phosphorylation of the 30-kDa protein of tobacco mosaic virus. *FEBS Lett.* **313**, 181–184.

Watanabe, Y., Ogawa, T., Takahashi, H. *et al.* (1995). Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonucleases. *FEBS Lett.* **372**, 165–168.

Waterhouse, P.M. and Helms, K. (1985). *Metopalophium dirhodum* (Walker): a newly arrived vector of barley yellow dwarf virus in Australia. *Australas. Plant Pathol.* **14**, 64–66.

Waterhouse, P.M. and Upadhyaya, N.M. (1999). Genetic engineering of virus resistance. In: K. Shimamoto (ed.) *Molecular Biology of Rice*, pp.257–281. Springer, Tokyo.

Waterhouse, P.M., Gildow, F.E. and Johnstone, G.R. (1988). Luteovirus group. Commonwealth Mycological Institute/ Association of Applied Biologists, *Descriptions of Plant Viruses*, No. 339.

Waterhouse, P.M., Graham, M.W. and Wang, M.-B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 13959–13964.

Waterhouse, P.M., Smith, N.A. and Wang, M.-B. (1999). Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends Plant Sci.* **4**, 452–457.

Waterhouse, P.M., Wang, M.-B. and Finnegan, E.J. (2001). Role of short RNAs in gene silencing. *Trends Plant Sci.* **6**, 297–301.

Waterman, M.S. (ed.) (1988). *Mathematical Methods for DNA Sequences*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Waterworth, H.E. (1998). Certification for plant viruses: an overview. Breeding for resistance to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 325-331. APS Press, St. Paul, MN.

Waterworth, H.E. and Hadidi, A. (1998). Economic losses due to plant viruses. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds) *Plant Virus Disease Control*, pp. 1–13. APS Press, St Paul, MN.

Waterworth, H E., Tousignant, M.E. and Kaper, J.M. (1978). A lethal disease of tomato experimentally induced by RNA5 associated with cucumber mosaic virus isolated from *Commelina* from El Salvador. *Phytopathology* **68**, 561–566.

Waterworth, H.E., Kaper, J.M. and Tousignant, M.E. (1979). CARNA5, the small cucumber mosaic virus-dependent replicating RNA, regulates disease expression. *Science* **204**, 845–847.

Watson, L. and Gibbs, A.J. (1974). Taxonomic patterns in the host ranges of viruses among grasses, and suggestions on generic sampling for host-range studies. *Ann. Appl. Biol.* **77**, 23–32.

Watson, M.A. and Heathcote, G.D. (1965). The use of sticky traps and the relation of their catches of aphids to the spread of viruses in crops. *Rep. Rothamsted Exp. Stn.* pp. 292–300.

Watson, M.A. and Roberts, F.M. (1939). A comparative study of the transmission of *Hyocyamus* virus 3, potato virus Y and cucumber mosaic virus by the vector *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflexus* (Buckton) and *Macrosiphum gei* (Koch). *Proc. R. Soc. London B* **127**, 543–576.

Watson, M.A., Heathcote, G.D., Lauckner, F.B. and Sowray, P.A. (1975). The use of weather data and counts of aphids in the field to predict the incidence of yellowing viruses of sugar-beet crops in England in relation to the use of insecticides. *Ann. Appl. Biol.* **81**, 181–198.

Watts, J.W., King, J.M. and Stacey, N.J. (1987). Inoculation of protoplasts with viruses by electroporation. *Virology* **157**, 40–46.

Watts, L.E. (1975). The response of various breeding lines of lettuce to beet western yellows virus. *Ann. Appl. Biol.* **81**, 393–397.

Way, R.D. and Gilmer, R.M. (1963). Reductions in fruit sets on cherry trees pollinated with pollen from trees with sour cherry yellows. *Phytopathology* **53**, 399–401.

Wayadande, A.C. and Nault, L.R. (1992). Leafhopper probing behavior associated with maize chlorotic dwarf virus transmission in maize. *Phytopathology* **83**, 522–526.

Webb, D.R., Bonfiglioli, R.G., Carraro, L., Osler, R. and Symons, R.H. (1999). Oligonucleotides as hybridisation probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. *Phytopathology* **89**, 894–901.

Webb, J.E., Wallwork, J.A. and Elgood, J.H. (1978). *Guide to Invertebrate Animals*. Macmillan, London.

Weber, H. and Pfitzner, A.J.P. (1998). *Tm-2²* resistance in tomato requires recognition of the carboxy terminus of the movement protein of tomato mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 498–503.

Weber, H., Schultze, S. and Pfitzner, A.J.P. (1993). Amino acid substitutions in the tomato mosaic virus 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the *Tm-2²* resistance gene in tomato. *J. Virol.* **67**, 6432–6438.

Webley, D.P. and Stone, L.E.W. (1972). Field experiments on potato aphids and virus spread in South Wales 1966/9. *Ann. Appl. Biol.* **72**, 197–203.

Weidemann, H.L. and Maiss, E. (1996). Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. *J. Plant Dis. Protect.* **103**, 337–345.

Weidemann, H.L., Lesemann, D., Paul, H.L. and Koenig, R. (1975). Das Broad Bean Wilt-Virus als Ursache für eine neue Vergilbungskrankheit des Spinats in Deutschland. *Phytopathol. Z.* **84**, 215–221.

Weiland, J.J. and Dreher, T.W. (1989). Infectious TYMV RNA from cloned cDNA: effects *in vitro* and *in vivo* of point substitutions in the initiation codons of two extensively overlapping ORFs. *Nucl. Acids Res.* **17**, 4675–4687.

Weiland, J.J. and Edwards, M.C. (1994). Evidence that the –a gene of barley stripe mosaic virus encodes determinants of pathogenicity to oat (*Avena sativa*). *Virology* **201**, 116–126.

Weiland, J.J. and Edwards, M.C. (1996). A single nucleotide substitution in the a gene confers oat pathogenicity to barley stripe mosaic virus strain ND18. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 62–67.

Weiller, G.F., McClure, M.A. and Gibbs, A.J. (1995). Molecular phylogenetic analysis. In: A.J. Gibbs, C.H. Calisher and F. García-Arenal (eds) *Molecular Basis for Virus Evolution*, pp. 553–585. Cambridge University Press, Cambridge.

Weiner, H.L., Drayna, D., Averill, D.R., Jr. and Fields, B.N. (1977). Molecular basis for reovirus virulence: role of the S1 gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 5744–5748.

Weintraub, M. and Ragetli, H.W.J. (1970). Electron microscopy of the bean and cowpea strains of southern bean mosaic virus within leaf cells. *J. Ultrastruct. Res.* **32**, 167–189.

Welkie, G.W. and Pound, G.S. (1958). Temperature influence on the rate of passage of cucumber mosaic virus through the epidermis of cowpea leaves. *Virology* **5**, 362–371.

Welkie, G.W., Young, S.F. and Miller, G.W. (1967). Metabolite changes induced by cucumber mosaic virus in resistant and susceptible strains of cowpea. *Phytopathology* **57**, 472–475.

Wellink, J. and van Kammen, A. (1988). Proteases involved in the processing of viral polyproteins. *Arch. Virol.* **98**, 1–26.

Wellink, J. and van Kammen, A. (1989). Cell-to-cell transport of cowpea mosaic virus requires both the 58K/48K proteins and the capsid proteins. *J. Gen. Virol.* **70**, 2279–2286.

Wellink, J., Rezelman, G., Goldbach, R. and Beyreuther, K. (1986). Determination of the proteolytic processing sites in the polyprotein encoded by the bottom component RNA of cowpea mosaic virus. *J. Virol.* **59**, 50–58.

Wellink, J., Jaegle, M. and Goldbach, R. (1987a). Detection of a novel protein encoded by the bottom-component RNA of cowpea mosaic virus, using antibodies raised against a synthetic peptide. *J. Virol.* **61**, 236–238.

Wellink, J., Jaegle, M., Prinz, H., van Kammen, A. and Goldbach, R. (1987b). Expression of the middle component RNA of cowpea mosaic virus *in vivo*. *J. Gen. Virol.* **68**, 2577–2585.

Wellink, J., van Lent, J. and Goldbach, R. (1988). Detection of viral proteins in cytopathic structures in cowpea protoplasts infected with cowpea mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **69**, 751–755.

Wellink, J., Verver, J., van Lent, J. and van Kammen, A. (1996). Capsid proteins of cowpea mosaic virus transiently expressed in protoplasts form virus-like particles. *Virology* **224**, 352–355.

Wellink, J., Le Gall, O., Sanfacon, H., Ikegami, M. and Jones, A.T. (2000). Family *Comoviridae*. In: M.H.V. van Regenmortel *et al.* (eds) *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 691–701. Academic Press, New York.

Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D. and Sachs, A.B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* **2**, 135–140.

Wen, F. and Lister, R.M. (1991). Heterologous encapsidation in mixed infections among four isolates of barley yellow dwarf virus. *J. Gen. Virol.* **72**, 2217–2223.

Werker, A.R., Dewar, A.M. and Harrington, R. (1998). Modelling the incidence of virus yellows in sugar beet in the UK in relation to the numbers of migrating *Myzus persicae*. *J. Appl. Ecol.* **35**, 811–818.

Wetter, C. (1975). Tabakmosaikvirus und Para-Tabakmosaikvirus in Zigaretten. *Naturwissenshaften* **62**, 533.

Wetter, C. and Bernard, M. (1977). Identifizierung, Reinigung und serologischer Nachweis von Tabakmosaikvirus und Par-Tabakmosaikvirus aus Zigaretten. *Phytopathol. Z.* **90**, 257–267.

Wetzel, T., Dietzgen, R.G. and Dale, J.L. (1994). Genomic organization of lettuce necrotic yellows rhabdovirus. *Virology* **200**, 401–412.

Whalen, M.C., Stall, R.E. and Staskawicz, B.J. (1988). Characterisation of a gene from a tomato pathogen determining hypersensitive resistance in non-host species and genetic analysis of this resistance in bean. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 6743–6747.

Whenham, R.J. (1989). Effect of systemic tobacco mosaic virus infection on endogenous cytokinin concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves: consequences for the control of resistance and symptom development. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **35**, 85–95.

Whenham, R.J. and Fraser, R.S.S. (1981). Effect of systemic and local-lesion-forming strains of tobacco mosaic virus on abscisic acid concentration in tobacco leaves: consequences for the control of leaf growth. *Physiol. Plant Pathol.* **18**, 267–278.

Whenham, R.J. and Fraser, R.S.S. (1982). Does tobacco mosaic virus RNA contain cytokinins? *Virology* **118**, 263–266.

Whenham, R.J., Fraser, R.S.S. and Snow, A. (1985). Tobacco mosaic virus-induced increase in abscisic acid concentration in tobacco leaves: intracellular location and relationship to symptom severity and to extent of virus multiplication. *Physiol. Plant Pathol.* **26**, 379–387.

Whitcomb, R.F. and Black, L.M. (1961). Synthesis and assay of wound-tumor soluble antigen in an insect vector. *Virology* **15**, 136–145.

Whitcomb, R.F. and Davies, E.E. (1970). Mycoplasma and phytoarboviruses as plant pathogens persistently transmitted by insects. *Annu. Rev. Entomol.* **15**, 405–464.

White, J.L. (1982). Regeneration of virus-free plants from yellow-green areas and TMV-induced enations of *Nicotiana tomentosa*. *Phytopathology* **72**, 866–867.

White, J.L. and Brakke, M.K. (1983). Protein changes in wheat infected with wheat streak mosaic virus and in barley infected with barley stripe mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* **22**, 87–100.

White, J.L. and Kaper, J.M. (1987). Absence of lethal stem necrosis in select *Lycopersicon* spp. infected by cucumber mosaic virus strain D and its necrogenic satellite CARNA5. *Phytopathology* **77**, 808–811.

White, J.L. and Kaper, J.M. (1989). A simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tissue samples. *J. Virol. Methods* **23**, 83–94.

White, J.L., Wu, F.-S. and Murakishi, H.H. (1977). The effect of low-temperature pre-incubation treatment of tobacco and soybean callus cultures on rates of tobacco- and southern bean mosaic virus synthesis. *Phytopathology* **67**, 60–63.

White, K.A. (1996). Formation and evolution of Tombusvirus defective interfering RNAs. *Sem. Virol.* **7**, 409–416.

White, K.A. and Morris, T.J. (1999). Defective and defective interfering RNAs of monopartite plus-strand RNA viruses. *Curr. Top. Microbiol.* **239**, 1–17.

White, K.A., Bancroft, J.B. and Mackie, G.A. (1992). Coding capacity determines *in vivo* accumulation of a defective RNA of clover yellow mosaic virus. *J. Virol.* **66**, 3069–3076.

White, P.S., Morales, F. and Roossinck, M.J. (1995). Interspecific reassortment of genomic segments in the evolution of cucumoviruses. *Virology* **207**, 334–337.

White, R.F. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* **99**, 410–412.

White, R.F. and Antoniw, J.F. (1983). Direct control of virus diseases. *Crop Prot.* **2**, 259–271.

White, R.F. and Sugars, J.M. (1996). The systemic infection by tobacco mosaic virus of tobacco plants containing the *N* gene at temperatures below 28 degrees C. *J. Phytopathol.* **144**, 139–142.

White, R.G., Badelt, K., Overall, R.L. and Vesk, M. (1994). Actin associated with plasmodesmata. *Protoplasma* **180**, 169–184.

Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101–1115.

Whitham, S., McCormick, S. and Baker, B. (1996). The *N* gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 8776–8781.

Whitham, S.A., Yamamoto, M.L. and Carrington, J.C. (1999). Selectable viruses and altered susceptibility mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 772–777.

Whitmoyer, R.E., Nault, L.R. and Bradfute, O.E. (1972). Fine structure of *Aceria tulipae* (Acarina: Eriophyidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **65**, 201–215.

Whittaker, G.R. and Helenius, A. (1998). Nuclear import and export of viruses and viral genomes. *Virology* **246**, 1–23.

Wijkamp, I. and Peters, D. (1993). Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay. *Phytopathology* **83**, 986–991.

Wijkamp, I., van Lent, J., Kormelink, R., Goldbach, R. and Peters, D. (1993). Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector. *J. Gen. Virol.* **74**, 341–349.

Wijkamp, I., Almarza, N., Goldbach, R. and Peters, D. (1995). Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology* **85**, 1069–1074.

Wijkamp, I., van de Wetering, F., Goldbach, R. and Peters, D. (1996). Transmission of tomato spotted wilt virus by *Frankliniella occidentalis*: median acquisition and inoculation access period. *Ann. Appl. Biol.* **129**, 303–313.

Wikoff, W.R., Tsai, C.J., Wang, G., Baker, T.S. and Johnson, J.E. (1997). The structure of cucumber mosaic virus: cryoelectron microscopy, X-ray crystallography, and sequence analysis. *Virology* **232**, 91–97.

Wilcoxson, R.D., Johnson, L.E.B. and Frosheiser, F.I. (1975). Variation in the aggregation forms of alfalfa mosaic virus strains in different alfalfa organs. *Phytopathology* **65**, 1249–1254.

Wildy, P. (1971). Classification and Nomenclature of Viruses. First Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Monogr. Virol.* **5**, 1–65.

Williams, R.C. and Wycoff, R.G.W. (1944). The thickness of electron microscopic objects. *J. Appl. Phys.* **15**, 712–716.

Williamson, K.I. and Taylor, W.B. (1958). The analysis of particle counts by the spray-drop method. *Br. J. Appl. Physiol.* **9**, 264–267.

Willison, J.H.M. (1976). The hexagonal lattice spacing on intracellular crystalline tobacco mosaic virus. *J. Ultrastr. Res.* **54**, 176–182.

Wilson, H.R., Tollin, P., Sawyer, L., Robinson, D.J., Price, N.C. and Kelly, S.M. (1991). Secondary structure of narcissus mosaic virus coat protein. *J. Gen. Virol.* **72**, 1479–1480.

Wilson, T.M.A. (1984a). Cotranslational disassembly of tobacco mosaic virus *in vitro*. *Virology* **137**, 255–265.

Wilson, T.M.A. (1984b). Cotranslational disassembly increases the efficiency of expression of TMV RNA in wheat germ cell-free extracts. *Virology* **138**, 353–356.

Wilson, T.M.A. (1985). Nucleocapsid disassembly and early gene expression by positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **66**, 1201–1207.

Wilson, T.M.A. (1986). Expression of the large 5' proximal cistron of tobacco mosaic virus by 70S ribosomes during cotranslational disassembly in a prokaryotic cell-free system. *Virology* **152**, 277–279.

Wilson, T.M.A. (1993). Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 34–41.

Wilson, T.M.A. and Davies, J.W. (1994). New roads to crop protection against viruses. *Outlook Agric.* **23**, 33–39.

Wilson, T.M.A. and Glover, J.F. (1983). The origin of multiple polypeptides of molecular weight below 110,000 encoded by tobacco mosaic virus RNA in the messenger-dependent rabbit reticulocyte lysate. *Biochim. Biophys. Acta* **739**, 35–41.

Wilson, T.M.A. and McNicol, J.W. (1995). A conserved, precise RNA encapsidation pattern in Tobamovirus particles. *Arch. Virol.* **140**, 1677–1685.

Wilson, T.M.A. and Perham, R.N. (1985). Modification of the coat protein charge and its effect on the stability of the U1 strain of tobacco mosaic virus at alkaline pH. *Virology* **140**, 21–27.

Wilson, T.M.A. and Watkins, P.A.C. (1985). Cotranslational disassembly of a cowpea strain (Cc) of TMV: evidence that viral RNA-protein interactions at the assembly origin block ribosome translocation *in vitro*. *Virology* **145**, 346–349.

Wilson, T.M.A., Perham, R.N., Finch, J.T. and Butler, P.J.G. (1976). Polarity of the RNA in the tobacco mosaic virus particle and the direction of protein stripping in sodium dodecyl sulphate. *FEBS Lett.* **64**, 285–289.

Wimmer, E. Hellen, C.U. and Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 353–436.

Windsor, I.M. and Black, L.M. (1973). Evidence that clover club leaf is caused by a rickettsia-like organism. *Phytopathology* **63**, 1139–1148.

Wingard, S.A. (1928). Host range and symptoms of ringspot, a virus disease of plants *J. Agric. Res.* **37**, 127–153.

Winter, E., Yamamoto, F., Almoguera, C. and Perucho, M. (1985). A method to detect and characterise point mutations in transcribed genes: amplification and overexpression of the mutant C-K1-*ras* allele in human tumor cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **82**, 7575–7579.

Wintermantel, W.M. and Schoelz, J.E. (1996). Isolation of recombinant viruses between cauliflower mosaic virus and a viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure. *Virology* **223**, 156–164.

Wintermantel, W.M and Zaitlin, M. (2000). Transgene translatability increases effectiveness of replicase-mediated resistance to cucumber mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **81**, 587–595.

Wintermantel, W.M., Anderson, E.J. and Schoelz, J.E. (1993). Identification of domains within gene VI of cauliflower mosaic virus that influence systemic infection of *Nicotiana bigelovii* in a light-dependent manner. *Virology* **196**, 789–798.

Wisler, G.C., Duffus, J.E., Liu, H.-Y. and Li, R.H. (1998). Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. *Plant Dis.* **82**, 270–280.

Wittmann, H.G. and Wittmann-Liebold, B. (1966). Protein chemical studies of two RNA viruses and their mutants. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 163–172.

Wittmann, H.G., Wittmann-Liebold, B. and Jauregui-Adell, J.Z. (1965). Die primäre Proteinstruktur temperatur-sensitiver Mutanten de Tabakmosaikvirus. *Z. Naturforsch.* **20b**, 1224–1234.

Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M.G. and Laliberté, J.-F. (1997). Interaction of the viral protein genome linked to turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso)4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**, 84–92.

Wobbe, K.K., Akgoz, M., Dempsey, D'M.A. and Klessig, D.F. (1998). A single amino acid change in turnip crinkle virus movement protein p8 affects RNA binding and virulence on *Arabidopsis thaliana*. *J. Virol.* **72**, 6247–6250.

Wobus, C.E., Skaf, J.S., Schultz, M.H. and de Zoeten, G.A. (1998). Sequencing, genomic localization and initial characterization of the VPg of pea enation mosaic enamovirus. *J. Gen. Virol.* **79**, 2023–2025.

Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N. and Lucas, W.J. (1989). Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* **246**, 377–379.

Wolfe, K.H., Li, W.-H. and Sharp, P.M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 9054–9058.

Wolfe, K.H., Gouy, M., Yang, Y.-W., Sharp, P.M. and Li, W.-H. (1989). Date of the monocot–dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 6201–6205.

Wolstenholme, G.E.W. and O'Connor, M. (eds) (1971). *Strategy of the Viral Genome*. Churchill–Livingstone, Edinburgh.

Woo, Y.-M., Itaya, A., Owens, R.A. *et al.* (1999). Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *Plant J.* **17**, 627–635.

Wood, G.A. (1983). Problems associated with the introduction of virus- and mycoplasma-free apple trees to New Zealand orchards. *Acta Hortic.* **130**, 257–262.

Wood, H.A. (1973). Viruses with double-stranded RNA genomes. *J. Gen. Virol.* (Suppl.) **20**, 61–85.

Woodford, J.A.T. and Gordon, S.C. (1978). Virus-like symptoms in red raspberry leaves caused by fenitrothion. *Plant Pathol.* **27**, 77–81.

Woodford, J.A.T., Gordon, S.C. and Foster, G.N. (1988). Sideband application of systemic granular pesticides for the control of aphids and potato leaf roll virus. *Crop Prot.* **7**, 96–105.

Woolston, C.J., Covey, S.N., Penswick, J.R. and Davies, J.W. (1983). Aphid transmission and a polypeptide are specified by a defined region of the cauliflower mosaic virus genome. *Gene* **23**, 15–23.

Woolston, C.J., Czapiewski, L.G., Markham, P.G., Goad, A.S., Hull, R. and Davies, J.W. (1987). Location and sequence of a region of cauliflower mosaic virus gene 2 responsible for aphid transmissibility. *Virology* **160**, 246–251.

Woolston, C.J., Reynolds, H.V., Stacey, N.J. and Mullineaux, P.M. (1989). Replication of wheat dwarf virus DNA in protoplasts and analysis of coat protein mutants in protoplasts and plants. *Nucl. Acids Res.* **17**, 6029–6041.

Worley, J.F. (1965). Translocation of southern bean mosaic virus in phloem fibres. *Phytopathology* **55**, 1299–1302.

Wright, E.A., Heckel, T., Groenendijk, J., Davies, J.W. and Boulton, M.I. (1997). Splicing features in maize streak virus virion, and complementary-sense gene expression. *Plant J.* **12**, 1285–1297.

Wrischer, M. (1973). The effect of ethionine on the fine structure of bean chloroplasts. *Cytobiologie* **7**, 211–214.

Wroth, J.M., Dilworth, M.J and Jones, R.A.C. (1993). Impaired nodule function in *Medicago polymorpha* L. infected with alfalfa mosaic virus. *New Phytol.* **124**, 243–250.

Wu, B. and White, K.A. (1999). A primary determinant of cap-independent translation is located in the 3'-proximal region of the tomato bushy stunt virus genome. *J. Virol.* **73**, 8982–8988.

Wu, B., Hammar, L., Xing, L. *et al.* (2000). Phytoreovirus $T = 1$ core plays critical roles in organizing the outer capsid of T = 13 quasiequivalence. *Virology* **271**, 18–25.

Wu, F.S. and Murakishi, H.H. (1979). Synthesis of virus and virus-induced RNA in southern bean mosaic virus-infected soybean cell cultures. *J. Gen. Virol.* **45**, 149–160.

Wu, G., Kang, L. and Tien, P. (1989). The effect of satellite RNA on cross-protection among cucumber mosaic virus strains. *Ann. Appl. Biol.* **114**, 489–496.

Wu, G.-J. and Bruening, G. (1971). Two proteins from cowpea mosaic virus. *Virology* **46**, 596–612.

Wu, J.-H. (1973). Wound-healing as a factor in limiting the size of lesions of *Nicotiana glutinosa* leaves infected by the very mild strain of tobacco mosaic virus (TMV-VM). *Virology* **51**, 474–484.

Wu, R.Y. and Su, H.J. (1991). Regeneration of healthy banana plantlets from banana bunchy top-infected tissues cultures at high temperature. *Plant Pathol.* **40**, 4–7.

Wu, R.Y., You, L.R. and Soong, T.S. (1994b). Nucleotide sequences of two single-stranded DNAs associated with banana bunchy top virus. *Phytopathology* **84**, 952–958.

Wu, S., Rinehart, C.A. and Kaesberg, P. (1987). Sequence and organisation of Southern bean mosaic virus genomic RNA. *Virology* **161**, 73–80.

Wu, X. and Shaw, J.G. (1996). Bidirectional uncoating of the genomic RNA of a helical virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 2981–2984.

Wu, X. and Shaw, J.G. (1997). Evidence that a viral replicase protein is involved in the disassembly of tobacco mosaic virus *in vivo*. *Virology* **239**, 426–434.

Wu, X. and Shaw, J.G. (1998). Evidence that assembly of a potyvirus begins near the 5' terminus of the viral RNA. *J. Gen. Virol.* **79**, 1525–1529.

Wu, X., Beachy, R.N., Wilson, T.M.A. and Shaw, J.G. (1990). Inhibition of uncoating of tobacco mosaic virus particles in protoplasts from transgenic tobacco plants that express the viral coat protein gene. *Virology* **179**, 893–895.

Wu, X., Xu, Z. and Shaw, J.G. (1994). Uncoating of tobacco mosaic virus RNA in protoplasts. *Virology* **200**, 256–262.

Wu-Scharf, D., Jeong, B.-R., Zhang, C. and Cerutti, H. (2000). Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* **290**, 1159–1162.

Wutscher, H.K. and Shull, A.V. (1975). Machine-hedging of citrus trees and transmission of exocortis and xyloporosis viruses. *Plant Dis. Rep.* **59**, 368–369.

Wyatt, S.D. and Kuhn, C.W. (1977). Highly infectious RNA isolated from cowpea chlorotic mottle virus with low specific infectivity. *J. Gen. Virol.* **35**, 175–180.

Wyatt, S.D. and Kuhn, C.W. (1980). Derivation of a new strain of cowpea chlorotic mottle virus from cowpeas. *J. Gen. Virol.* **49**, 289–296.

Wyatt, S.D. and Shaw, J.G. (1975). Retention and dissociation of tobacco mosaic virus by tobacco protoplasts. *Virology* **63**, 459–465.

Wyatt, S.D., Seybert, L.J. and Mink, G. (1988). Status of the barley yellow dwarf problem of winter wheat in eastern Washington. *Plant Dis.* **72**, 110–113.

Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Guo, H., Garcia, J.A. and Gutiérrez, C. (1999). GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Mol. Biol.* **39**, 647–656.

Xie, Z., Fan, B., Chen, C. and Chen, Z. (2001). An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 6516–6521.

Xin, H.-W., Ji, L.-H., Scott, S.W., Symons, R.H. and Ding, S.-W. (1998). Ilarviruses encode a cucumovirus-like 2b gene that is absent in other genera within the *Bromoviridae*. *J. Virol.* **72**, 6956–6959.

Xiong, C., Muller, S., Lebeurier, G. and Hirth, L. (1982). Identification by immunoprecipitation of cauliflower mosaic virus *in vitro* major translation product with a specific antiserum against viroplasm protein. *EMBO J.* **1**, 971–976.

Xiong, C., Lebeurier, G. and Hirth, L. (1984). Detection *in vivo* of a new gene product (gene III) of cauliflower mosaic virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **81**, 6608–6612.

Xiong, Y. and Eichbush, T.H. (1990). Origins and evolution of retroelements based on their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* **9**, 3353–3362.

Xiong, Z. and Lommel, S.A. (1989). The complete nucleotide sequence and genome organization of red clover necrotic mosaic virus RNA1. *Virology* **171**, 543–554.

Xiong, Z., Kim, K.H., Giesman-Cookmeyer, D. and Lommel, S.A. (1993). The role of red clover necrotic mottle virus capsid and cell-to-cell movement proteins in systemic infection. *Virology* **192**, 27–32.

Xoconostle-Cazares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R. *et al.* (1999). Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* **283**, 94–98.

Xu, Z., Anzola, J.V., Nalin, C.M. and Nuss, D.L. (1989b). The 3'-terminal sequence of a wound turnout virus transcript can influence conformational and functional properties associated with the 5' terminus. *Virology* **170**, 511–522.

Yamaguchi, A. and Hirai, T. (1967). Symptom expression and virus multiplication in tulip petals. *Phytopathology* **57**, 91–92.

Yamamoto, K. and Yoshikura, H. (1986). Relation between genomic and capsid structures in RNA viruses. *Nucl. Acids Res.* **14**, 389–396.

Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M. *et al.* (2000). TOM1, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 10107–10112.

Yamaoka, N., Furusawa, I. and Yamamoto, M. (1982a). Infection of turnip protoplasts with cauliflower mosaic virus DNA. *Virology* **122**, 503–505.

Yamaoka, N., Morita, T., Furusawa, I. and Yamamoto, M. (1982b). Effect of temperature on the multiplication of cauliflower mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **61**, 283–287.

Yamaya, J., Yoshioka, M., Meshi, T., Okada, Y. and Ohno, T. (1988). Expression of tobacco mosaic virus RNA in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* **211**, 520–525.

Yamazaki, H. and Kaesberg, P. (1963a). Isolation and characterisation of a protein subunit of broadbean mottle virus. *J. Mol. Biol.* **6**, 465–473.

Yamazaki, H. and Kaesberg, P. (1963b). Degradation of bromegrass mosaic virus with calcium chloride and the isolation of its protein and nucleic acid. *J. Mol. Biol.* **7**, 760–762.

Yang, A.F. and Hamilton, R.I. (1974). The mechanism of seed transmission of tobacco ringspot virus in soybean. *Virology* **62**, 26–37.

Yang, C.-C., Liu, J.-S., Lin, C.-P. and Lin, N.-S. (1997a). Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of a bamboo mosaic potexvirus isolate from common bamboo (*Bambusa vulgaris* McClure). *Bot. Bull. Acad. Sin.* **38**, 77–84.

Yang, T., Ding, B., Baulcombe, D.C. and Verchot, J. (2000). Cell-to-cell movement of the 25K protein of potato virus X is regulated by three other viral proteins. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **13**, 599–605.

Yang, X., Hadidi, A. and Garnsey, S.M. (1992). Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology* **82**, 279–285.

Yang, Y. and Klessig, D.F. (1996). Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncognene homolog from tobacco. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 14972–14977.

Yang, Y., Shah, J. and Klessig, D.F. (1997b). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* **11**, 1621–1639.

Yarwood, C.E. (1951). Associations of rust and virus infections. *Science* **114**, 127–128.

Yarwood, C.E. (1952). The phosphate effect in plant virus inoculations. *Phytopathology* **42**, 137–143.

Yarwood, C.E. (1955). Deleterious effects of water in plant virus inoculations. *Virology* **1**, 268–285.

Yarwood, C.E. (1968). Sequence of supplements in virus inoculations. *Phytopathology* **58**, 132–136.

Yarwood, C.E. (1973). Quick drying versus washing in virus inoculations. *Phytopathology* **63**, 72–76.

Yassi, M.N. and Dodds, J.A.Q. (1998). Specific sequence changes in the 5' terminal region of the genome of satellite tobacco mosaic virus are required for adaptation to tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **79**, 905–913.

Yassi, M.N., Ritzenhaler, C., Brugidou, C., Fauquet, C. and Beachy, R.N. (1994). Nucleotide sequence and genome characterization of rice yellow mottle virus RNA. *J. Gen. Virol.* **75**, 249–257.

Yassin, A.M. (1968). Transmission of viruses by *Longidorus elongatus*. *Nematologica* **14**, 419–428.

Yassin, A.M. (1983). A review of factors influencing control strategies against tomato leafcurl virus disease in The Sudan. *Trop. Pest Manag.* **29**, 253–256.

Ye, X.S., Pan, S.Q. and Ku, J. (1989). Pathogenesis-related proteins and systemic resistance to blue mould and tobacco mosaic virus induced by tobacco mosaic virus, *Peronospora tabacina* and aspirin. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **35**, 161–175.

Yeh, S.-D. and Gonsalves, D. (1984). Purification and immunological analyses of cylindrical-inclusion protein induced by papaya ringspot virus and watermelon mosaic virus 1. *Phytopathology* **74**, 1273–1278.

Yeh, S.-D., Gonsalves, D., Wang, H.-L., Namba, R. and Chiu, R.-J. (1988). Control of papaya ringspot virus by cross protection. *Plant Dis.* **72**, 375–380.

Yeh, T.Y., Lin, B.Y., Chang, Y.C., Hsu, Y.H. and Lin, N.S (1999). A defective RNA associated with bamboo mosaic virus and the possible common mechanisms for RNA recombination in potexviruses. *Virus Genes* **18**, 121–128.

Yencho, G.C., Cohen, M.B. and Byrne, P.F. (2000). Applications of tagging and mapping insect resistance loci in plants. *Annu. Rev. Entomol.* **45**, 393–422.

Yepes, L.M., Fuchs, M., Slightom, J.L. and Gonsalves, D. (1996). Sense and antisense coat protein constructs confer high levels of resistance to tomato ringspot nepovirus in transgenic *Nicotiana* species. *Phytopathology* **86**, 417–424.

Yi, S.Y., Yu, S.H. and Choi, D. (1999). Molecular cloning of a catalase DNA from *Nicotiana glutinosa* L, and its repression by tobacco mosaic virus infection. *Mol. Cells* **9**, 320–325.

Yie, Y., Wu, Z.X., Wang, S.Y. *et al.* (1995). Rapid production and field testing of homozygous transgenic tobacco lines with resistance conferered by expression of satellite RNA and coat protein of cucumber mosaic virus. *Transgen. Res.* **4**, 256–263.

Yi-Li, R., Wen-Li, C. and Rui-Fen, L. (1981). Studies on the rice virus vector small brown planthopper *Laodelphax striatella* Fallen. *Acta Entomol. Sin.* **24**, 290.

Yin, Y. and Beachy, R.N. (1995). The regulatory regions of the rice tungro bacilliform virus promoter and interacting nuclear factors in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J.* **7**, 969–980.

Yin, Y., Zhu, Q., Da, S., Lamb, C. and Beachy, R.N. (1997a). RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, functions in vascular development. *EMBO J.* **16**, 5247–5259.

Yin, Y., Vhen, L. and Beachy, R. (1997b). Promoter elements required for phloem-specific gene expression from the RTBV promoter in rice. *Plant J.* **12**, 1179–1188.

Yoon, H.Y., Choi, K.Y. and Song, B.D. (2000). Fluorometric assay of turnip mosaic virus NIa protease. *Anal. Biochem.* **277**, 228–231.

Yoshida, K., Goto, T. and Iizuka, N. (1985). Attenuated isolates of cucumber mosaic virus produced by satellite RNA and cross protection between attenuated isolates and virulent ones. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* **51**, 238–242.

Yoshikawa, N., Poolpol, P. and Inouye, I. (1986). Use of a dot immunobinding assay for rapid detection of strawberry pseudo mild yellow edge virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* **52**, 728–731.

Yoshikawa, N., Sasaki, E., Kato, M. and Takahashi, T. (1992). The nucleotide sequence of apple stem grooving capillovirus genome. *Virology* **191**, 98–105.

Young, B.D. and Anderson, M.L.M. (1985). Quantitative analysis of solution hybridization. In: B.D. Hames and S.J. Higgins (eds) *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, pp. 47–71. IRL Press, Oxford.

Young, M.J., Daubert, S.D. and Shepherd, R.J. (1987). Gene I products of cauliflower mosaic virus detected in extracts of infected tissue. *Virology* **158**, 444–446.

Young, N.D. and Zaitlin, M. (1986). Analysis of tobacco mosaic virus replicative structures synthesized *in vitro*. *Plant Mol. Biol.* **6**, 455–465.

Ysebaert, M., van Emmelo, J. and Fiers, W. (1980). Total nucleoside sequence of a nearly full-size DNA copy of satellite tobacco necrosis virus RNA. *J. Mol. Biol.* **143**, 273–287.

Yung, K.-H. and Northcote, D.H. (1975). Some enzymes present in the walls of mesophyll cells of tobacco leaves. *Biochem. J.* **151**, 141–144.

Yusibov, V. and Loesch-Fries, L.S. (1998). Functional significance of three basic N-terminal amino acids of alfalfa mosaic virus coat protein. *Virology* **242**, 1–5.

Zabalgogeazcoa, I.A. and Gildow, F.E. (1992). Double-stranded ribonucleic acid in 'Barsoy' barley. *Plant Sci.* **91**, 45–53.

Zabalgogeazcoa, I.A, Cox-Foster, D.C. and Gildow, F.E. (1993). Pedigree analysis of the transmission of a double-stranded RNA in barley cultivars. *Plant Sci.* **83**, 187–194.

Zabel, P., Moerman, M., van Straaten, F., Goldbach, R. and van Kammen, A. (1982). Antibodies against the genome-linked protein VPg of cowpea mosaic virus recognize a 60,000 dalton precursor polypeptide. *J. Virol.* **41**, 1083–1088.

Zaccomer, B., Haenni, A.-L. and Macaya, G. (1995). The remarkable variety of plant RNA virus genomes. *J. Gen. Virol.* **76**, 231–247.

Zagorski, W., Morch, M.-D. and Haenni, A.-L. (1983). Comparison of three different cell-free systems for turnip yellow mosaic virus RNA translation. *Biochimie* **65**, 127–133.

Zahm, P., Seong-Iyul, R. and Klaus, G. (1989). Promoter activity and expression of sequences from Ti-plasmid stably maintained in mammalian cells. *Mol. Cell. Biochem.* **90**, 9–18.

Zaitlin, M. (1962). Graft transmissibility of a systemic virus infection to a hypersensitive host—an interpretation. *Phytopathology* **52**, 1222–1223.

Zaitlin, M. (1998). The discovery of the causal agent of the tobacco mosaic disease. In: S.-D. Kung and S.-F. Yang (eds) *Discoveries in Plant Biology*, pp. 106–110. World Scientific Publishing, Hong Kong.

Zaitlin, M. and Ferris, W.R. (1964). Unusual aggregation of a nonfunctional tobacco mosaic virus protein. *Science* **143**, 1451–1452.

Zaitlin, M. and Israel, H.W. (1975). Tobacco mosaic virus (type strain). *CMI/AAB Descriptions Plant Viruses* No. 151, pp. 1–5.

Zaitlin, M. and Palukaitis, P. (2000). Advances in understanding plant viruses and virus diseases. *Annu Rev. Phytopathol.* **38**, 117–143.

Zaitlin, M., Duda, C.T. and Petti, M.A. (1973). Replication of tobacco mosaic virus V: properties of the bound and solubilized replicase. *Virology* **53**, 300–311.

Zaitlin, M., Beachy, R.N. and Bruening, G. (1977). Lack of molecular hybridization between RNAs of two strains of TMV. A reconsideration of the criteria for strain relationships. *Virology* **82**, 237–241.

Zaitlin, M., Niblett, C.L., Dickson, E. and Goldberg, R.B. (1980). Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by solution and filter hybridization. *Virology* **104**, 1–9.

Zalloua, P.A., Buzayan, J.M. and Bruening, G. (1996). Chemical cleavage of 5′-linked protein from tobacco ringspot virus genomic RNAs and characterization of the protein-RNA linkage. *Virology* **219**, 1–8.

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 and 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25–33.

Zanotti, F.M.de A., Gibbs, M.J., Gould, E.A. and Holmes, E.C. (1996). A re-evaluation of the higher taxonomy of viruses based on RNA polymerases. *J. Virol.* **70**, 6083–6096.

Zanotto, P.M. de A., Gibbs, M.J., Gould, E.A. and Holmes, E.C. (1996). A reevaluation of the higher taxonomy of viruses based on RNA polymerases. *J. Virol.* **70**, 6083–6096.

Zaumeyer, W.J. and Meiners, J.P. (1975). Disease resistance in beans. *Annu. Rev. Phytopathol.* **13**, 313–334.

Zavriev, S.K. (1999). Carlaviruses. In: A. Granoff and R.G. Webster (eds) *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn, pp. 238–242. Academic Press, San Diego.

Zavriev, S.K., Hickey, C.M. and Lommel, S.A. (1996). Mapping of the red clover necrotic mosaic virus subgenomic RNA. *Virology* **216**, 407–410.

Zech, H. (1952). Untersuchungen über den Infektionsvorgang und die Wanderung des Tabakmosaikvirus im Pflanzenkörper. *Planta* **40**, 461–514.

Zelcer, A., Zaitlin, M., Robertson, H.D. and Dickson, E. (1982). Potato spindle tuber viroid-infected tissues contain RNA complementary to the entire viroid. *J. Gen. Virol.* **59**, 139–148.

Zerfass, K and Beier, H. (1992). The leaky UGA termination codon of tobacco rattle virus RNA is suppressed by tobacco chloroplast and cytoplasmic tRNAs^{trp} with CmCA anticodon. *EMBO J.* **11**, 4167–4173.

Zettler, F.W. (1967). A comparison of species of Aphididae with species of three other aphid families regarding virus transmission and probe behaviour. *Phytopathology* **57**, 398–400.

Zettler, F.W. and Hartman, R.D. (1987). Dasheen mosaic virus as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture. *Plant Dis.* **71**, 958–963.

Zeyen, R.J. and Banttari, E.E. (1972). Histology and ultrastructure of oat blue dwarf virus infected oats. *Can. J. Bot.* **50**, 2511–2519.

Zeyen, R.J., Stromberg, E.L. and Kuehnast, E.L. (1987). Long range aphid transport hypothesis for maize dwarf mosaic virus: history and distribution in Minnesota, USA. *Ann. Appl. Biol.* **111**, 325–336.

Zhan, X., Richardson, K.A., Haley, A. and Morris, B.A.M. (1993). The activity of the coat protein promoter of chloris striate mosaic virus is enhanced by its own and C1–C2 gene products. *Virology* **193**, 498–502.

Zhang, G. and Simon, A.E. (2001). Analysis of an RNA replication enhancer of a subviral RNA associated with turnip crinkle virus. Abstract W16–2, 20th Annual Meeting of the American Society for Virology.

Zhang, G., Slowinski, V. and White, A. (1999). Subgenomic mRNA regulation by distal RNA element in a (+)-strand RNA virus. *RNA* **5**, 550–561.

Zhang, G.C., Leung, C., Mardin, L., Rovinski, B. and White, K.A. (2000). *In planta* expression of HIV-1 p24 protein using an RNA virus-based expression vector. *Molec. Biotech.* **14**, 99–107.

Zhang, L., Zitter, T.A. and Palukaitis, P. (1991). Helper virus-dependent replication, nucleotide sequence and genome organization of the satellite virus of maize white line mosaic virus. *Virology* **180**, 467–473.

Zhang, S. and Klessig, D.F. (2000). Pathogen-induced MAP kinases in tobacco. In: *Results and Problems in Cell Differentiation*, Vol. 27, H. Hirt (ed.) *MAP Kinases in Plant Signal Transduction*, pp. 65–84. Springer, Berlin.

Zhang, S., Jones, M.J., Barker, P., Davies, J.W. and Hull, R. (1993). Molecular cloning and sequencing of coat protein-encoding cDNA of rice tungro spherical virus: a plant picornavirus. *Virus Genes* **7**, 121–132.

Zhang, W., Olson, N.H., Baker, T.S. *et al.* (2001). Structure of maize streak virus geminate particle. *Virology* **279**, 471–477.

Zhang, W.C., Yan, M.N. and Lou, C.H. (1990). Intercellular movement of protoplasm *in vivo* in developing endosperm of wheat caryopses. *Protoplasma* **153**, 193–203.

Zhang, Z.H. and Wu, L.P. (1998). Research and development of expressing antibodies in plants. *Prog. Biochem. Biophys.* **25**, 136–139.

Zhao, Y., Owens, R.A. and Hammond, R.W. (2001). Use of a vector based on potato virus X in a whole plant assay to demonstrate nuclear targeting of potato spindle tuber viroid. *J. Gen. Virol.* **82**, 1491–1497.

Zheng, H., Wang, G. and Zhang, L. (1997). Alfalfa mosaic virus movement protein induces tubules in plant protoplasts. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **10**, 1010–1014.

Zhou, G. and Rochow, W.F. (1984). Differences among five stages of *Schizaphis graminum* in transmission of a barley yellow dwarf luteovirus. *Phytopathology* **74**, 1450–1453.

Zhou, G., Lu, X., Lu, H., Lei, J., Chen, S. and Gong, Z. (1999). Rice ragged stunt oryzavirus: role of the viral spike protein in transmission by the insect vector. *Ann. Appl. Biol.* **135**, 573–578.

Zhou, H. and Jackson, A.O. (1996). Analysis of *cis*-acting elements required for replication of barley stripe mosaic virus RNAs. *Virology* **219**, 150–160.

Zhou, X., Liu, Y., Calvert, L. *et al.* (1997). Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic virus disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J. Gen. Virol.* **78**, 2101–2111.

Zhou, X., Liu, Y., Robinson, D.J. and Harrison, B.D. (1998). Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *J. Gen. Virol.* **79**, 915–923.

Zhu, Y., Green, L., Woo, Y.-M., Owens, R. and Ding, B. (2001). Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* **279**, 69–77.

Zhuravlev, Yu.N., Reifman, V.G., Shumilova, L.A., Yudakova, Z.S. and Pisetskaya, N.F. (1975). Absorption of ^{32}P-labelled tobacco mosaic virus by isolated tobacco protoplasts and deproteinization of the virus in them. *Sov. Plant Physiol. (Engl. translation)* **22**, 941–943.

Ziemiecki, A. and Peters, D. (1976). The proteins of sowthistle yellow vein virus: characterization and location. *J. Gen. Virol.* **32**, 369–381.

Ziemiecki, A. and Wood, K.R. (1976). Proteins synthesized by cucumber cotyledons infected with two strains of cucumber mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **31**, 373–381.

Zimmermann, D. and van Regenmortel, M.H.V. (1989). Spurious cross-reactions between plant viruses and monoclonal antibodies can be overcome by saturating ELISA plates with milk proteins. *Arch. Virol.* **106**, 15–22.

Zimmern, D. (1977). The nucleotide sequence at the origin for assembly on tobacco mosaic virus RNA. *Cell* **11**, 463–482.

Zimmern, D. (1982). Do viroids and RNA viruses derive from a system that exchanges genetic information between eukaryotic cells? *Trends Biochem. Sci.* **7**, 205–207.

Zimmern, D. (1983). An extended secondary structure model for the TMV assembly origin, and its correlation with protection studies and an assembly defective mutant. *EMBO J.* **2**, 1901–1907.

Zimmern, D. and Wilson T.M.A. (1976). Location of the origin for viral reassembly on tobacco mosaic virus RNA and its relation to stable fragment. *FEBS Lett.* **71**, 294–298.

Zink, F.W. and Duffus, J.E. (1972). Association of beet western yellows and lettuce mosaic viruses with internal rib necrosis of lettuce. *Phytopathology* **62**, 1141–1144.

Zink, F.W., Grogan, R.G. and Welch, J.E. (1956). The effect of percentage of seed transmission upon subsequent spread of lettuce mosaic virus. *Phytopathology* **46**, 622–624.

Zinovkin, R.A. and Agranovsky, A.A. (1998). Detection of the nonstructural p21 protein of beet yellows closterovirus *in vivo* with polyclonal antibodies to bacterially expressed protein. *Mol. Biol.* **32**, 928–931.

Zinovkin, R.A., Jelkmann, W. and Agranovsky, A.A. (1999). The minor coat protein of beet yellows closterovirus encapsidates the 5′ terminus of RNA in virions. *J. Gen. Virol.* **80**, 269–272.

Zlotnick, A., Aldrich, R., Johnson, J.M. *et al.* (2000). Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology* **277**, 450–456.

Zrein, M., Burckard, J. and van Regenmortel, M.H.V. (1986). Use of the biotin–avidin system for detecting a broad range of serologically related plant viruses by ELISA. *J. Virol. Methods* **13**, 121–128.

Zuidema, D. and Jaspars, E.M.J. (1985). Specificity of RNA and coat protein interaction in alfalfa mosaic virus and related viruses. *Virology* **140**, 342–350.

Zuidema, D., Bierhuizen, M.F.A. and Jaspars, E.M.J. (1983). Removal of the N-terminal part of alfalfa mosaic virus coat protein interferes with the specific binding to RNA1 and genome activation. *Virology* **129**, 255–260.

Zuidema, D., Heaton, L.A. and Jackson, A.O. (1987). Structure of the nucleocapsid protein gene of sonchus yellow net virus. *Virology* **159**, 373–380.

Zulauf, M. (1977). Swelling of brome mosaic virus as studied by intensity fluctuation spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **114**, 259–266.

附录 1A

表 1　植物病毒名称及其缩写（采用 ICTV 第 7 次报告中的名单，根据第 8 次报告做了部分修改）。斜体的病毒名称为病毒种，正体的名称为暂定种（tentative species）。

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Abutilon mosaic virus (AbMV)	苘麻花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Abutilon yellows virus (AbYV)	苘麻黄化病毒	*Closteroviridae*	*Crinivirus*
Acalypha yellow mosaic virus (AYMV)	铁苋菜黄花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
African cassava mosaic virus (ACMV)	非洲木薯花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Ageratum yellow vein virus (AYVV)	藿香蓟黄脉病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Aglaonema bacilliform virus (ABV)	万年青杆状病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Agropyron mosaic virus (AgMV)	冰草花叶病毒	*Potyviridae*	*Rymovirus*
Ahlum waterborne virus (AWBV)	阿赫卢姆水传病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Alfalfa cryptic virus 1 (ACV-1)	苜蓿隐潜病毒 1 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Alfalfa cryptic virus 2 (ACV-2)	苜蓿隐潜病毒 2 号	*Partitiviridae*	*Betacryptovirus*
Alfalfa mosaic virus (AMV)	苜蓿花叶病毒	*Bromoviridae*	*Alfamovirus*
Alligatorweed stunting virus (AWSV)	空心苋矮化病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Alpinia mosaic virus (AlpMV)	山姜(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Alstroemeria mosaic virus (AlMV)	六出花(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Alstroemeria streak virus (AlStV)	六出花(属)线条病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Alternanthera mosaic virus (AltMV)	莲子草花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Althaea rosea enation virus (AREV)	蜀葵耳突病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Amaranthus leaf mottle virus (AmLMV)	苋(属)叶斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Amazon lily mosaic virus (ALiMV)	亚马逊百合花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
American hop latent virus (AHLV)	美洲啤酒花潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
American plum line pattern virus (APLPV)	美洲李线纹病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Andean potato latent virus (APLV)	安第斯马铃薯潜病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Andean potato mottle virus (APMoV)	安第斯马铃薯斑驳病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Aneilema mosaic virus(AneMV)	安尼米墨草(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Anthoxanthum latent blanching virus (ALBV)	黄花茅(属)潜白化病毒		*Hordeivirus*
Anthoxanthum mosaic virus (AntMV)	黄花茅(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Anthriscus latent virus (AntLV)	峨参(属)潜隐病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Anthriscus yellows virus (AYV)	峨参(属)黄化病毒	*Sequiviridae*	*Waikavirus*
Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)	苹果褪绿叶斑病毒	*Flexiviridae*	*Trichovirus*
Apple dimple fruit viroid (ADFVd)	苹果凹果类病毒	*Pospiviroidae*	*Apscaviroid*
Apple fruit crinkle viroid (AFCVd)	苹果皱果类病毒	Viroid	尚未归类
Apple latent spherical virus (ALSV)	苹果潜隐球状病毒		*Cheravirus*
Apple mosaic virus (ApMV)	苹果花叶病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Apple scar skin viroid (ASSVd)	苹果锈果类病毒	*Pospiviroidae*	*Apscaviroid*
Apple stem grooving virus (ASGV)	苹果茎沟病毒	*Flexiviridae*	*Capillovirus*
Apple stem pitting virus (ASPV)	苹果茎痘病毒	*Flexiviridae*	*Foveavirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Aquilegia necrotic mosaic virus(ANMV)	耧斗菜(属)坏死花叶病毒	*Caulimoviridae*	*Caulimovirus*
Aquilegia necrotic ringspot virus (AqNRSV)	耧斗菜(属)坏死环斑病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Arabis mosaic virus (ArMV)	南芥菜花叶病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Araujia mosaic virus (ArjMV)	萝藦花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Arracacha latent virus(ALV)	滇芎(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Arracacha virus A (AVA)	滇芎(属)A病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Arracacha virus B (AVB)	滇芎(属)B病毒		*Cheravirus*
Arracacha virus Y (AVY)	滇芎(属)Y病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Artichoke Aegean ringspot virus (AARSV)	爱琴海菊芋环斑病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Artichoke curly dwarf virus (ACDV)	菊芋卷缩病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Artichoke Italian latent virus (AILV)	意大利菊芋潜病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Artichoke latent virus (ArLV)	菊芋潜病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Artichoke latent virus M (ArLVM)	菊芋潜M病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Artichoke latent virus S (ArLVS)	菊芋潜S病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Artichoke mottled crinkle virus (AMCV)	菊芋斑驳皱缩病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Artichoke vein banding virus (AVBV)	菊芋镶脉病毒		*Cheravirus*
Artichoke yellow ringspot virus (AYRSV)	菊芋黄环斑病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Asparagus virus 1 (AV-1)	天门冬(属)病毒1号	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Asparagus virus 2 (AV-2)	天门冬(属)病毒2号	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Asparagus virus 3 (AV-3)	天门冬(属)病毒3号	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Asystasia gangetica mottle virus (AGMoV)	十万错斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Asystasia golden mosaic virus (AGMV)	十万错金色花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Atropa belladonna virus (AtBV)	颠茄病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Aucuba bacilliform virus (AuBV)	桃叶珊瑚杆状病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Australian grapevine viroid (AGVd)	澳洲葡萄类病毒	*Pospiviroidae*	*Apscaviroid*
Avocado sunblotch viroid (ASBVd)	鳄梨日斑类病毒	*Avsunviroidae*	*Avsunviroid*
Bajra streak virus (BaSV)	珍珠粟线条病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Bamboo mosaic virus (BaMV)	竹花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Banana bract mosaic virus (BBrMV)	香蕉苞片花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Banana bunchy top virus (BBTV)	香蕉束顶病毒	*Nanoviridae*	*Babuvirus*
Banana streak virus (BSV)	香蕉线条病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Barley mild mosaic virus (BaMMV)	大麦轻型花叶病毒	*Potyviridae*	*Bymovirus*
Barley stripe mosaic virus (BSMV)	大麦条纹花叶病毒		*Hordeivirus*
Barley virus B1 (BarV-B1)	大麦B1病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Barley yellow dwarf virus-GPV (BYDV-GPV)	大麦黄矮病毒GPV	*Luteoviridae*	*Enamovirus*
Barley yellow dwarf virus-MAV (BYDV-MAV)	大麦黄矮病毒MAV	*Luteoviridae*	*Luteovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV)	大麦黄矮病毒 PAV	*Luteoviridae*	*Luteovirus*
Barley yellow dwarf virus-RMV (BYDV-RMV)	大麦黄矮病毒 RMV	*Luteoviridae*	*Enamovirus*
Barley yellow dwarf virus-SGV (BYDV-SGV)	大麦黄矮病毒 SGV	*Luteoviridae*	*Enamovirus*
Barley yellow mosaic virus (BaYMV)	大麦黄花叶病毒	*Potyviridae*	*Bymovirus*
Barley yellow striate mosaic virus (BYSMV)	大麦黄条点花叶病毒	*Rhabdoviridae*	*Cytorhabdovirus*
Bean calico mosaic virus (BCaMV)	菜豆花斑花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Bean common mosaic necrosis virus (BCMNV)	菜豆普通花叶坏死病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Bean common mosaic virus (BCMV)	菜豆普通花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Bean dwarf mosaic virus (BDMV)	菜豆矮花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Bean golden mosaic virus (BGMV)	菜豆金色花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Bean golden yellow mosaic virus (BGYMV)	菜豆金色黄花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Bean leafroll virus (BLRV)	菜豆卷叶病毒	*Luteoviridae*	*Luteoviridae*
Bean mild mosaic virus (BMMV)	菜豆轻型花叶病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Bean pod mottle virus (BPMV)	菜豆荚斑驳病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Bean rugose mosaic virus (BRMV)	菜豆粗缩花叶病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Bean yellow dwarf virus (BeYDV)	菜豆黄矮病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Bean yellow mosaic virus (BYMV)	菜豆黄花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Bean yellow vein-banding virus (BYVBV)	菜豆黄色镶脉病毒		*Umbravirus*
Beet black scorch virus (BBSV)	甜菜黑色焦枯病毒	*Tombusviridae*	*Necrovirus*
Beet cryptic virus 1 (BCV-1)	甜菜潜隐病毒 1 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Beet cryptic virus 2 (BCV-2)	甜菜隐潜病毒 2 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Beet cryptic virus 3 (BCV-3)	甜菜隐潜病毒 3 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Beet curly top virus (BCTV)	甜菜曲顶病毒	*Geminiviridae*	*Curtovirus*
Beet leaf curl virus (BLCV)	甜菜卷叶病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Beet mild curly top virus(BMCTV)	甜菜轻型曲顶病毒	*Geminiviridae*	*Curtovirus*
Beet mild yellowing virus (BMYV)	甜菜轻型黄化病毒	*Luteoviridae*	*Polerovirus*
Beet mosaic virus (BtMV)	甜菜花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)	甜菜坏死黄脉病毒		*Benyvirus*
Beet pseudoyellows virus (BPYV)	甜菜伪黄化病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Beet ringspot virus (BRSV)	甜菜环斑病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Beet severe curly top virus (BSCTV)	甜菜严重曲顶病毒	*Geminiviridae*	*Curtovirus*
Beet soil-borne mosaic virus (BSBMV)	甜菜土传花叶病毒		*Benyvirus*
Beet soil-borne virus (BSBV)	甜菜土传病毒		*Pomovirus*
Beet virus Q (BVQ)	甜菜 Q 病毒		*Pomovirus*
Beet western yellows virus (BWYV)	甜菜西方黄化病毒	*Luteoviridae*	*Polerovirus*
Beet yellow stunt virus (BYSV)	甜菜黄矮病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Beet yellows virus (BYV)	甜菜黄化病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Belladonna mottle virus (BeMV)	颠茄斑驳病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Bermuda grass etched-line virus (BELV)	狗牙根蚀纹线病毒	*Tymoviridae*	*Marafivirus*
Bhendi yellow vein mosaic virus (BYVMV)	贝因迪黄脉花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Bidens mosaic virus (BiMV)	鬼针草(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Bidens mottle virus (BiMoV)	鬼针草(属)斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Black raspberry necrosis virus (BRNV)	黑悬钩子坏死病毒		(尚未归类)
Blackcurrant reversion virus (BRV)	黑醋栗退化病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Blackgram mottle virus (BMoV)	黑绿豆斑驳病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Blueberry leaf mottle virus (BLMoV)	蓝莓(乌饭树)叶斑驳病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Blueberry mosaic viroid-like RNA (BlUMVd-RNA)	蓝莓花叶类病毒样 RNA	Viroid	(尚未归类)
Blueberry red ringspot virus (BRRV)	蓝莓(乌饭树)红环斑病毒	*Caulimoviridae*	*Soymovirus*
Blueberry scorch virus (BlScV)	蓝莓(乌饭树)焦枯病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Blueberry shock virus (BlShV)	乌饭树休克病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Blueberry shoestring virus (BSSV)	乌饭树带化病毒		*Sobemovirus*
Boletus virus X (BolVX)	牛肝菌 X 病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Brachypodium yellow streak virus (BYSV)	短柄草黄色线条病毒		(尚未归类)
Bramble yellow mosaic virus (BrmYMV)	欧洲黑莓黄花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Brazilian wheat spike virus(BWSpV)	巴西小麦穗病毒		*Tenuivirus*
Broad bean mottle virus (BBMV)	蚕豆斑驳病毒	*Bromoviridae*	*Bromovirus*
Broad bean necrosis virus (BBNV)	蚕豆坏死病毒		*Pomovirus*
Broad bean stain virus (BBSV)	蚕豆杂色病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Broad bean true mosaic virus (BBTMV)	蚕豆真花叶病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Broad bean wilt virus 1 (BBWV-1)	蚕豆萎蔫病毒 1 号	*Comoviridae*	*Fabavirus*
Broad bean wilt virus 2 (BBWV-2)	蚕豆萎蔫病毒 2 号	*Comoviridae*	*Fabavirus*
Broccoli necrotic yellows virus (BNYV)	分枝花椰菜坏死黄化病毒	*Rhabdoviridae*	*Cytorhabdovirus*
Bromus striate mosaic virus (BrSMV)	雀麦(属)条点花叶病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Brome mosaic virus (BMV)	雀麦花叶病毒	*Bromoviridae*	*Bromovirus*
Brome streak mosaic virus (BStMV)	雀麦线条花叶病毒	*Potyviridae*	*Rymovirus*
Brome streak virus (BStV)	雀麦条纹病毒	*Potyviridae*	*Tritimovirus*
Bromus striate mosaic virus (BrSMV)	雀麦条点花叶病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Bryonia mottle virus (BryMoV)	泻根(属)斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Burdock stunt viroid (BuSVd)	牛蒡矮化类病毒	Viroid	(尚未归类)
Burdock yellows virus (BuYV)	牛蒡黄化病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Butterbur mosaic virus (ButMV)	蜂斗菜(属)花叶病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Cacao swollen shoot virus (CSSV)	可可肿枝病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Cacao yellow mosaic virus (CYMV)	可可黄花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Cactus virus 2 (CV-2)	仙人掌病毒 2 号	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Cactus virus X (CVX)	仙人掌 X 病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Calanthe mild mosaic virus (CalMMV)	虾脊兰轻型花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Callistephus chinensis chlorosis virus (CCCV)	翠菊褪绿病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Calopogonium yellow vein virus (CalYVV)	毛蔓豆黄脉病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Canary reed mosaic virus (CRMV)	虉草(草芦)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Canavalia maritima mosaic virus (CnMMV)	海刀豆花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Canna yellow mottle virus (CaYMV)	美人蕉黄斑驳病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Caper latent virus (CapLV)	山柑(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Caraway latent virus (CawLV)	葛缕子(页蒿)潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Cardamine chlorotic fleck virus (CCFV)	碎米荠(属)褪绿斑病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Cardamine latent virus (CaLV)	碎米荠(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Cardamom mosaic virus (CdMV)	豆蔻花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Carnation bacilliform virus (CBV)	香石竹杆状病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Carnation cryptic virus 1 (CCV-1)	香石竹潜病毒 1 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Carnation cryptic virus 2 (CCV-2)	香石竹潜病毒 2 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Carnation etched ring virus (CERV)	香石竹蚀环病毒	*Caulimoviridae*	*Caulimovirus*
Carnation Italian ringspot virus (CIRV)	香石竹意大利环斑病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Carnation latent virus (CLV)	香石竹潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Carnation mottle virus (CarMV)	香石竹斑驳病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Carnation necrotic fleck virus (CNFV)	香石竹坏死斑点病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Carnation ringspot virus (CRSV)	香石竹环斑病毒	*Tombusviridae*	*Dianthovirus*
Carnation vein mottle virus (CVMOV)	香石竹脉斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Carnation yellow stripe virus (CYSV)	香石竹黄条病毒	*Tombusviridae*	*Necrovirus*
Carrot latent virus (CtLV)	胡萝卜潜病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Carrot mosaic virus (CtMV)	胡萝卜花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Carrot mottle mimic virus (CMoMV)	胡萝卜拟斑驳病毒		*Umbravirus*
Carrot mottle virus (CMoV)	胡萝卜斑驳病毒		*Umbravirus*
Carrot red leaf virus (CtRLV)	胡萝卜红叶病毒	*Luteoviridae*	*Enamovirus*
Carrot temperate virus 1 (CTeV-1)	胡萝卜和性病毒 1 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Carrot temperate virus 2 (CTeV-2)	胡萝卜和性病毒 2 号	*Partitiviridae*	*Betacryptovirus*
Carrot temperate virus 3 (CTeV-3)	胡萝卜和性病毒 3 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Carrot temperate virus 4 (CTeV-4)	胡萝卜和性病毒 4 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Carrot thin leaf virus (CTLV)	胡萝卜细叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Carrot yellow leaf virus (CYLV)	胡萝卜黄叶病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Cassava American latent virus (CsALV)	美洲木薯潜病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Cassava common mosaic virus (CsCMV)	木薯普通花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Cassava green mottle virus (CsGMV)	木薯绿斑驳病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Cassava Ivorian bacilliform virus (CsIBV)	象牙海岸木薯杆状病毒		(尚未归类)
Cassava symptomless virus (CsSLV)	木薯无症病毒	*Rhadboviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Cassava vein mosaic virus (CsVMV)	木薯脉花叶病毒	*Caulimoviridae*	*Cavemovirus*
Cassava virus C (CsVC)	木薯C病毒		*Ourmiavirus*
Cassava virus X (CsVX)	木薯X病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Cassia mild mosaic virus (CasMMV)	决明(属)轻型花叶病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Cassia yellow blotch virus (CYBV)	决明(属)黄斑病毒	*Bromoviridae*	*Bromovirus*
Cassia yellow spot virus (CasYSV)	决明(属)黄点病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Cauliflower mosaic virus (CaMV)	花椰菜花叶病毒	*Caulimoviridae*	*Caulimovirus*
Celery mosaic virus (CeMV)	芹菜花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Celery yellow mosaic virus (CeYMV)	芹菜黄花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Centrosema mosaic virus (CenMV)	距瓣豆(属)花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Ceratobium mosaic virus (CerMV)	角藻花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Cereal chlorotic mottle virus (CCMoV)	禾谷褪绿斑驳病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Cereal yellow dwarf virus-RPS (CYDV-RPS)	禾谷黄矮病毒 RPS	*Luteoviridae*	*Polerovirus*
Cereal yellow dwarf virus-RPV (CYDV-RPV)	禾谷黄矮病毒 RPV	*Luteoviridae*	*Polerovirus*
Cestrum yellow leaf curling virus(CmYLCV)	夜香树(属)黄曲叶病毒	*Caulimoviridae*	*Caulimovirus*
Chara australis virus (ChaAV)	南方轮藻病毒		*Furovirus*
Chara corallina virus (ChaCV)	珊瑚轮藻病毒		*Tobamovirus*
Chayote mosaic virus (ChMV)	佛手瓜花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Chenopodium necrosis virus (ChNV)	藜属坏死病毒	*Tombusviridae*	*Necrovirus*
Cherry green ring mottle virus (CGRMV)	樱桃绿环斑驳病毒	*Flexiviridae*	*Foveavirus*
Cherry leaf roll virus (CLRV)	樱桃卷叶病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Cherry rasp leaf virus (CRLV)	樱桃锉叶病毒		*Cheravirus*
Cherry rosette virus (CRV)	樱桃丛簇病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Cherry virus A (CheVA)	樱桃A病毒	*Flexiviridae*	*Capillovirus*
Chickpea bushy dwarf virus (CpBDV)	鹰嘴豆丛矮病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Chickpea chlorotic dwarf virus (CpCDV)	鹰嘴豆褪绿矮缩病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Chickpea filiform virus (CpFV)	鹰嘴豆丝状病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Chickpea stunt disease-associated virus (CpSDaV)	鹰嘴豆矮化伴随病毒	*Luteoviridae*	*Luteoviridae*
Chicory yellow blotch virus(ChYBV)	菊苣黄斑病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Chicory yellow mottle virus (ChYMV)	菊苣黄斑驳病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Chilli veinal mottle virus (ChiVMV)	辣椒脉斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Chinese wheat mosaic virus(CWMV)	中国小麦花叶病毒		*Furovirus*
Chinese yam necrotic mosaic virus (ChYNMV)	薯蓣坏死花叶病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Chino del tomate virus (CdTV)	番茄皱叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Chloris striate mosaic virus (CSMV)	虎尾草条点花叶病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd)	菊花褪绿斑驳类病毒	*Avsunviroidae*	*Pelamoviroid*
Chrysanthemum frutescens virus (CFV)	木茼蒿病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)	菊茎坏死病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*
Chrysanthemum stunt viroid (CSVd)	菊矮化类病毒	*Pospiviroidae*	*Pospiviroid*
Chrysanthemum vein chlorosis virus (CVCV)	菊脉褪绿病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Chrysanthemum virus B (CVB)	菊B病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Citrus bent leaf viroid (CBLVd)	柑橘曲叶类病毒	*Pospiviroidae*	*Apscaviroid*
Citrus exocortis viroid (CEVd)	柑橘裂皮类病毒	*Pospiviroidae*	*Pospiviroid*
Citrus viroid Ⅲ (CVd-Ⅲ)	柑橘类病毒Ⅲ号	*Pospiviroidae*	*Apscaviroid*
Citrus viroid Ⅳ (CVd-Ⅳ)	柑橘类病毒Ⅳ号	*Pospiviroidae*	*Cocadviroid*
Citrus leaf blotch virus (CLBV)	柑橘叶斑病毒	*Flexiviridae*	*Citrivirus*
Citrus leaf rugose virus (CiLRV)	柑橘皱叶病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Citrus leprosis virus (CiLV)	柑橘粗糙病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Citrus mosaic virus (CMBV)	柑橘花叶病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Citrus psorosis virus (CPsV)	柑橘鳞皮病毒	*Ophioviridae*	*Ophiovirus*
Citrus tristeza virus (CTV)	柑橘速衰病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Citrus variegation virus (CVV)	柑橘杂色病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Clitoria yellow mosaic virus (CtYMV)	蝶豆(属)黄花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Clitoria yellow vein virus (CYVV)	蝶豆(属)黄脉病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Clover enation virus (CIEV)	三叶草耳突病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Clover yellow mosaic virus (ClYMV)	三叶草黄花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Clover yellow vein virus (ClYVV)	三叶草黄脉病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Clover yellows virus (CYV)	三叶草黄化病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Cocksfoot mild mosaic virus (CMMV)	鸭茅轻型花叶病毒		*Sobemovirus*
Cocksfoot mottle virus (CoMV)	鸭茅斑驳病毒		*Sobemovirus*
Cocksfoot streak virus (CSV)	鸭茅线条病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Cocoa necrosis virus (CONV)	可可坏死病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Coconut cadang-cadang viroid (CCCVd)	椰子死亡类病毒	*Pospiviroidae*	*Cocadviroid*
Coconut foliar decay virus (CFDV)	椰子叶衰病毒	*Nanoviridae*	*Nanovirus*
Coconut tinangaja viroid (CTiVd)	椰子败生类病毒	*Pospiviroidae*	*Cocadviroid*
Coffee ringspot virus (CoRSV)	咖啡环斑病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Cole latent virus (CoLV)	芸苔(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Coleus blumei viroid 1 (CbVd-1)	五彩苏类病毒1号	*Pospiviroidae*	*Coleviroid*
Coleus blumei viroid 2 (CbVd-2)	五彩苏类病毒2号	*Pospiviroidae*	*Coleviroid*
Coleus blumei viroid 3 (CbVd-3)	五彩苏类病毒3号	*Pospiviroidae*	*Colevirvid*
Colocasia bobone disease virus (CBDV)	芋(属)瘦小病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Colombian datura virus (CDV)	哥伦比亚曼陀罗病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Columnea latent viroid (CLVd)	金鱼花(属)潜隐类病毒	*Pospiviroidae*	*Pospiviroid*
Commelina mosaic virus (ComMV)	鸭跖草(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Commelina virus X (ComVX)	鸭跖草(属)X病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Commelina yellow mottle virus (ComYMV)	鸭跖草黄斑驳病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Coriander feathery red vein virus (CFRVV)	芫荽羽状红脉病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Cotton leaf crumple virus (CLCrV)	棉皱叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Cotton leaf curl virus Pakistan 1 (CLCuV Pkl)	棉花曲叶病毒巴基斯坦1号	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Cotton leaf curl virus Pakistan 2 (CLCuV-Pk2)	棉花曲叶病毒巴基斯坦2号	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Cow parsnip mosaic virus (CPaMV)	白芷花叶病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)	豇豆蚜传花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV)	豇豆褪绿斑驳病毒	*Bromoviridae*	*Bromovirus*
Cowpea golden mosaic virus (CPGMV)	豇豆金色花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Cowpea green vein banding virus (CGVBV)	豇豆绿镶脉病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Cowpea mild mottle virus (CPMMV)	豇豆轻型斑驳病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Cowpea mosaic virus (CPMV)	豇豆花叶病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Cowpea mottle virus (CPMoV)	豇豆斑驳病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Cowpea rugose mosaic virus (CPRMV)	豇豆皱缩花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Cowpea severe mosaic virus (CPSMV)	豇豆重型花叶病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Crimson clover latent virus (CCLV)	绛三叶草潜病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Crinum mosaic virus (CriMV)	文殊兰(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Croatian clover virus (CroCV)	克罗地亚三叶草病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Croton yellow vein mosaic virus (CYVMV)	巴豆(属)黄脉花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Crucifer infecting TMV (crTMV)	侵染十字花科植物的TMV		*Tobamovirus*
Crucifer strain of TMV (TMV-Cg)	TMV的十字花科株系		*Tobamovirus*
Cucumber chlorotic spot virus (CCSV)	黄瓜褪绿斑病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Cucumber cryptic virus (CuCV)	黄瓜隐潜病毒	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	黄瓜绿斑驳花叶病毒		*Tobamovirus*
Cucumber leaf spot virus (CLSV)	黄瓜叶斑病毒	*Tombusviridae*	*Aureusvirus*
Cucumber mosaic virus (CMV)	黄瓜花叶病毒	*Bromoviridae*	*Cucumovirus*
Cucumber necrosis virus (CuNV)	黄瓜坏死病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Cucumber soil-borne virus (CuSBV)	黄瓜土传病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV)	南瓜蚜传黄化病毒	*Luteoviridae*	*Polerovirus*
Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV)	南瓜黄色矮化失调病毒	*Closteroviridae*	*Crinivirus*
Cycas necrotic stunt virus (CNSV)	苏铁(属)坏死矮化病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Cymbidium mosaic virus (CymMV)	兰(属)花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Cymbidium ringspot virus (CymRSV)	兰(属)环斑病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Cynara virus (Cray)	菜蓟(属)病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Cynodon mosaic virus (CynMV)	狗牙根(属)花叶病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Cynosurus mottle virus (CnMoV)	洋狗尾草(属)斑驳病毒		*Sobemovirus*
Cypripedium chlorotic streak virus (CypCSV)	兜兰褪绿条纹病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Dahlia mosaic virus (DMV)	大丽花花叶病毒	*Caulimoviridae*	*Caulimovirus*
Dandelion latent virus (DaLV)	蒲公英潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Dandelion yellow mosaic virus (DaYMV)	蒲公英黄花叶病毒	*Sequiviridae*	*Sequivirus*
Daphne virus S (DVS)	瑞香(属)S病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Daphne virus X (DVX)	瑞香(属)X病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Daphne virus Y(DVY)	瑞香(属)Y病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Dasheen mosaic virus (DsMV)	芋花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Datura distortion mosaic virus (DDMV)	曼陀罗(属)扭曲花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Datura mosaic virus (DTMV)	曼陀罗(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Datura necrosis virus (DNV)	曼陀罗坏死病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Datura shoestring virus (DSSV)	曼陀罗鞋带病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Datura virus 437 (DV-437)	曼陀罗(属) 437 病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Datura yellow vein virus (DYVV)	曼陀罗(属)黄脉病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Dendrobium leaf streak virus (DLSV)	石斛(属)叶线条病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Dendrobium vein necrosis virus (DVNV)	石斛(属)脉坏死病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Desmodium mosaic virus (DesMV)	山蚂蝗(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Desmodium yellow mottle virus (DYMV)	山蚂蝗(属)黄斑驳病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Digitaria streak virus (DSV)	马唐(属)线条病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Digitaria striate mosaic virus (DiSMV)	马唐(属)条点花叶病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Digitaria striate virus (DiSV)	马唐(属)条点病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Diodea vein chlorosis virus (DVCV)	钮扣草脉褪绿病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Dioscorea bacilliform virus (DBV)	薯蓣(属)杆状病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Dioscorea latent virus (DLV)	薯蓣(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Dioscorea trifida virus (DTV)	三浅裂薯芋病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Dipladenia mosaic virus (DipMV)	双腺藤花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Dock mottling mosaic virus (DMMV)	酸模斑驳花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Dolichos yellow mosaic virus (DoYMV)	镰扁豆(属)黄花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Dulcamara mottle virus (DuMV)	欧白英斑驳病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Dulcamara virus A (DuVA)	欧白英 A 病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Dulcamara virus B (DuVB)	欧白英 B 病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
East African cassava mosaic virus (EACMV)	东非木薯花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Echinochloa hoja blanca virus (EHBV)	稗草白叶病毒		*Tenuivirus*
Echinochloa ragged stunt virus (ERSV)	稗草(属)齿叶矮缩病毒	*Reoviridae*	*Oryzavirus*
Eclipta yellow vein virus (EYVV)	鳢肠(属)黄脉病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Eggplant green mosaic virus (EGMV)	茄绿花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Eggplant latent viroid (ELVd)	茄潜隐类病毒	*Avsunviroidae*	*Elaviroid*
Eggplant mild mottle virus (EMMV)	茄轻型斑驳病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Eggplant mosaic virus (EMV)	茄花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Eggplant mottled crinkle virus (EMCV)	茄斑驳皱缩病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Eggplant mottled dwarf virus (EMDV)	茄斑驳矮缩病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Eggplant severe mottle virus (ESMoV)	茄重型斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Eggplant yellow mosaic virus (EYMV)	茄黄花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Elderberry latent virus (ElLV)	蓝筛朴潜病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Elderberry symptomless virus (ESLV)	蓝筛朴无症病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Elm mottle virus (EMoV)	榆斑驳病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Endive necrotic mosaic virus (ENMV)	苣荬菜坏死花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Epirus cherry virus (EpCV)	伊皮鲁斯樱桃病毒		*Ourmiavirus*
Erysimum latent virus (ErLV)	糖芥(属)潜病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Euonymus fasciation virus (EFV)	卫矛带化病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Euonymus mosaic virus (EuoMV)	卫矛(属)花叶病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Eupatorium yellow vein virus (EpYVV)	泽兰(属)黄脉病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Euphorbia leaf curl virus (EuLCV)	大戟(属)曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Euphorbia mosaic virus (EuMV)	大戟(属)花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Euphorbia ringspot virus (EuRSV)	大戟(属)环斑病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
European wheat striate mosaic virus (EWSMV)	欧洲小麦条点花叶病毒		*Tenuivirus*
Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV)	蚕豆坏死黄化病毒	*Nanoviridae*	*Nanovirus*
Fescue cryptic virus (FCV)	羊茅隐潜病毒	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Festuca leaf streak virus (FLSV)	羊茅(属)叶线条病毒	*Rhabdoviridae*	*Cytorhabdovirus*
Festuca necrosis virus (FNV)	羊茅(属)坏死病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Fig leaf chlorosis virus (FigLCV)	榕叶褪绿病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Fig virus S (FVS)	无花果 S 病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Figwort mosaic virus (FMV)	玄参花叶病毒	*Caulimoviridae*	*Caulimovirus*
Fiji disease virus (FDV)	甘蔗斐济病病毒	*Reoviridae*	*Fijivirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Finger millet mosaic virus (FMMV)	指状粟花叶病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Flame chlorosis virus (FlCV)	禾谷辐射褪绿病毒		(尚未归类)
Foxtail mosaic virus (FoMV)	狗尾草(属)花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Fragaria chiloensis latent virus (FClLV)	海滩草莓潜隐病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Frangipani mosaic virus (FrMV)	鸡蛋花花叶病毒		*Tobamovirus*
Freesia mosaic virus (FreMV)	香雪兰花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Fuchsia latent virus (FLV)	倒挂金钟(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Furcraea necrotic streak virus (FNSV)	假龙舌兰(属)坏死线条病毒	*Tombusviridae*	*Dianthovirus*
Galinsoga mosaic virus (GaMV)	牛膝菊(属)花叶病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Garland chrysanthemum temperate virus (GCTV)	茼蒿和性病毒	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Garlic common latent virus (GarCLV)	大蒜普通潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Garlic dwarf virus (GDV)	大蒜矮缩病毒	*Reoviridae*	*Fijivirus*
Garlic latent virus (GarLV)	大蒜潜隐病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Garlic mite-borne filamentous virus (GarMbFV)	大蒜螨传线状病毒	*Flexiviridae*	*Allexivirus*
Garlic mite-borne latent virus (GarMbLV)	大蒜螨传潜隐病毒	*Flexiviridae*	*Allexivirus*
Garlic mosaic virus (GarMV)	大蒜花叶病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Garlic virus A (GarV-A)	大蒜 A 病毒	*Flexiviridae*	*Allexivirus*
Garlic virus B (GarV-B)	大蒜 B 病毒	*Flexiviridae*	*Allexivirus*
Garlic virus C (GarV-C)	大蒜 C 病毒	*Flexiviridae*	*Allexivirus*
Garlic virus D (GarV-D)	大蒜 D 病毒	*Flexiviridae*	*Allexivirus*
Garlic virus X (GarV-X)	大蒜 X 病毒	*Flexiviridae*	*Allexivirus*
Gentiana latent virus (GenLV)	龙胆潜隐病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Gerbera symptomless virus (GeSLV)	扶郎花(属)无症病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Ginger chlorotic fleck virus (GCFV)	姜褪绿斑点病毒		*Sobemovirus*
Gloriosa stripe mosaic virus (GSMV)	嘉兰(属)条纹花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Glycine mosaic virus (GMV)	大豆(属)花叶病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Glycine mottle virus (GMoV)	大豆(属)斑驳病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Gomphrena virus (GoV)	千日红弹状病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Grapevine Algerian latent virus (GALV)	阿尔及利亚葡萄潜病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Grapevine berry inner necrosis virus (GINV)	葡萄浆果坏死病毒	*Flexiviridae*	*Trichovirus*
Grapevine Bulgarian latent virus (GBLV)	保加利亚葡萄潜病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Grapevine chrome mosaic virus (GCMV)	葡萄铬黄花叶病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Grapevine fanleaf virus (GFLV)	葡萄扇叶病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Grapevine fleck virus (GFkV)	葡萄斑点病毒	*Tymoviridae*	*Maculavirus*
Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)	葡萄卷叶伴随病毒 1 号	*Closteroviridae*	*Ampelovirus*
Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2)	葡萄卷叶伴随病毒 2 号	*Closteroviridae*	*Closterovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Grapevine leaf roll-associated virus 3 (GLRaV-3)	葡萄卷叶伴随病毒 3 号	*Closteroviridae*	*Ampelovirus*
Grapevine leaf roll-associated virus 4 (GLRaV-4)	葡萄卷叶伴随病毒 4 号	*Closteroviridae*	*Ampelovirus*
Grapevine leaf roll-associated virus 5 (GLRaV-5)	葡萄卷叶伴随病毒 5 号	*Closteroviridae*	*Ampelovirus*
Grapevine leaf roll-associated virus 6 (GLRaV-6)	葡萄卷叶伴随病毒 6 号	*Closteroviridae*	*Ampelovirus*
Grapevine leaf roll-associated virus 7 (GLRaV-7)	葡萄卷叶伴随病毒 7 号	*Closteroviridae*	*Crinivirus*
Grapevine Tunisian ringspot virus (GTRSV)	突尼斯葡萄环斑病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Grapevine virus A (GVA)	葡萄 A 病毒	*Flexiviridae*	*Vitivirus*
Grapevine virus B (GVB)	葡萄 B 病毒	*Flexiviridae*	*Vitivirus*
Grapevine virus C (GVC)	葡萄 C 病毒	*Flexiviridae*	*Vitivirus*
Grapevine virus D (GVD)	葡萄 D 病毒	*Flexiviridae*	*Vitivirus*
Grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1)	葡萄黄点类病毒 1 号	*Pospiviroidae*	*Apscaviroid*
Grapevine yellow speckle viroid 2 (GYSVd-2)	葡萄黄点类病毒 2 号	*Pospiviroidae*	*Apscaviroid*
Groundnut bud necrosis virus (GBNV)	花生芽坏死病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*
Groundnut chlorotic fan-spot virus (GCFSV)	花生褪绿扇斑病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*
Groundnut eyespot virus (GEV)	花生眼斑病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Groundnut ringspot virus (GRSV)	花生环斑病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*
Groundnut rosette assistor virus (GRAY)	花生丛簇协助病毒	*Luteoviridae*	*Luteoviridae*
Groundnut rosette virus (GRV)	花生丛簇病毒		*Umbravirus*
Groundnut yellow spot virus (GYSV)	花生黄斑病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*
Guar symptomless virus (GSLV)	瓜尔豆无症病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Guinea grass mosaic virus (GGMV)	大黍(羊草)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Gynura latent virus (GyLV)	三七草(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Habenaria mosaic virus (HaMV)	玉凤花(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Hart's tongue fern mottle virus (HTFMoV)	对开蕨斑驳病毒		(尚未归类)
Helenium virus S (HVS)	堆心菊(属)S 病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Helenium virus Y (HVY)	堆心菊(属)Y 病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Helleborus mosaic virus (HeMV)	铁筷子(属)花叶病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Henbane mosaic virus (HMV)	天仙子花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Heracleum latent virus (HLV)	独活(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Vitivirus*
Heracleum virus 6 (HV-6)	独活(属)病毒 6 号	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Hibiscus chlorotic ringspot virus (HCRSV)	木槿(属)褪绿环斑病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Hibiscus latent ringspot virus (HLRSV)	木槿(属)潜隐环斑病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Hippeastrum mosaic virus (HiMV)	朱顶红(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Holcus lanatus yellowing virus (HLYV)	绒毛草黄化病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Holcus streak virus (HSV)	绒毛草(属)线条病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Hollyhock leaf curl virus (HLCV)	蜀葵曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Honeysuckle latent virus (HnLV)	忍冬潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Honeysuckle yellow vein mosaic virus (HYVMV)	忍冬黄脉花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Hop latent virus (HpLV)	啤酒花潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Hop latent viroid (HpLVd)	啤酒花潜隐类病毒	*Pospiviroidae*	*Cocadviroid*
Hop mosaic virus (HpMV)	啤酒花花叶病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Hop stunt viroid (HSVd)	啤酒花矮化类病毒	*Pospiviroidae*	*Hostuviroid*
Hop trefoil cryptic virus 1 (HTCV-1)	草原车轴草隐潜病毒 1 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Hop trefoil cryptic virus 2 (HTCV-2)	草原车轴草隐潜病毒 2 号	*Partitiviridae*	*Betacryptovirus*
Hop trefoil cryptic virus 3 (HTCV-3)	草原车轴草隐潜病毒 3 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Hordeum mosaic virus (HoMV)	大麦(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Rymovirus*
Horsegram yellow mosaic virus (HgYMV)	长豇豆黄花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Horseradish curly top virus (HrCTV)	辣根曲顶病毒	*Geminiviridae*	*Curtovirus*
Horseradish latent virus (HrLV)	辣根潜病毒	*Caulimoviridae*	*Caulimovirus*
Hosta virus X (HVX)	玉簪属(百合科)植物病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Humulus japonicus latent virus (HILV)	律草潜隐病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Hungarian datura innoxia virus (HDIV)	匈牙利毛曼陀罗病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Hyacinth mosaic virus (HyaMV)	风信子花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Hydrangea latent virus (HdLV)	绣球(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Hydrangea mosaic virus (HdMV)	绣球花叶病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Hydrangea ringspot virus (HdRSV)	绣球环斑病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Hypochoeris mosaic virus (HYMV)	猫儿菊(属)花叶病毒		*Furovirus*
Impatiens latent virus (ILV)	凤仙花(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Impatiens necrotic spot virus (INSV)	凤仙花坏死斑病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*
Indian cassava mosaic virus (ICMV)	印度木薯花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Indian peanut clump virus (IPCV)	印度花生丛簇病毒		*Pecluvirus*
Indian pepper mottle virus (IPMoV)	印度辣椒斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Indian tomato leaf curl virus (IToLCV)	印度番茄曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Indonesian soybean dwarf virus (?) (ISDV)	印度尼西亚大豆矮缩病毒	*Luteoviridae*	*Luteoviridae*
Iranian wheat stripe virus (IWSV)	伊朗小麦条纹病毒		*Tenuivirus*
Iresine viroid 1 (IrVd-1)	血苋(属) 类病毒 1 号	*Pospiviroidae*	*Pospiviroid*
Iris fulva mosaic virus (IFMV)	暗黄鸢尾花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Iris germanica leaf stripe virus (IGLSV)	德国鸢尾叶条纹病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Iris mild mosaic virus (IMMV)	鸢尾轻型花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Iris severe mosaic virus (ISMV)	鸢尾重型花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Iris yellow spot virus (IYSV)	鸢尾黄斑病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*
Isachne mosaic virus (IsaMV)	柳叶箬(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Ivy vein clearing virus (IVCV)	常春藤脉明病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Jatropha mosaic virus (JMV)	麻风树(属)花叶病毒	*Gemniviridae*	*Begomovirus*
Johnsongrass mosaic virus (JGMV)	石茅高粱(约翰逊草)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Kalanchoe latent virus (KLV)	伽蓝菜(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Kalanchoe mosaic virus (KMV)	伽蓝菜(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Kalanchoe top-spotting virus (KTSV)	伽蓝菜顶端斑点病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Kennedya virus Y (KVY)	肯尼迪豆 Y 病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Kennedya yellow mosaic virus (KYMV)	肯尼迪豆黄花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Konjac mosaic virus (KoMV)	魔芋花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Kyuri green mottle mosaic virus (KGMMV)	日本黄瓜绿斑驳花叶病毒		*Tobamovirus*
Laelia red leafspot virus (LRLV)	蕾丽兰(属)红叶斑病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Lamium mild mosaic virus (LMMV)	野芝麻(属)轻型花叶病毒	*Comoviridae*	*Fabavirus*
Lato river virus (LRV)	拉托河病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Launaea arborescens stunt virus (LArSV)	乔木状栓果菊矮化病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Leek white stripe virus (LWSV)	韭葱白条病毒	*Tombusviridae*	*Necrovirus*
Leek yellow stripe virus (LYSV)	韭葱黄条病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Lemon scented thyme leaf chlorosis virus (LSTCV)	柠檬味百里香叶褪绿病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Leonurus mosaic virus (LeMV)	益母草(属)花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Lettuce big-vein associated virus (LBVaV)	莴苣巨脉伴随病毒		*Varicosavirus*
Lettuce chlorosis virus (LCV)	莴苣褪绿病毒	*Closteroviridae*	*Crinivirus*
Lettuce infectious yellows virus (LIYV)	莴苣传染性黄化病毒	*Closteroviridae*	*Crinivirus*
Lettuce mosaic virus (LMV)	莴苣花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Lettuce necrotic yellows virus (LNYV)	莴苣坏死黄化病毒	*Rhabdoviridae*	*Cytorhabdovirus*
Lettuce speckles mottle virus (LSMV)	莴苣小斑驳病毒		*Umbravirus*
Lilac chlorotic leafspot virus (LiCLV)	丁香褪绿叶斑病毒	*Flexiviridae*	*Colpillovirus*
Lilac mottle virus (LiMoV)	丁香斑驳病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Lilac ring mottle virus (LiRMoV)	丁香环斑驳病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Lilac ringspot virus (LiRSV)	丁香环斑病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Lily mild mottle virus (LiMMoV)	百合轻型斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Lily mottle virus (LMoV)	百合斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Lily symptomless virus (LSLV)	百合无症病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Lily virus X (LVX)	百合 X 病毒	*Flexiviridae*	*Potexvius*
Limabean golden mosaic virus (LGMV)	利马豆金色花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Lisianthus necrosis virus (LNV)	草原龙胆(属)坏死病毒	*Tombusviridae*	*Necrovirus*
Little cherry virus (LChV)	小樱桃病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Lolium ryegrass virus (LoRV)	黑麦草病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Lotus stem necrosis virus (LoSNV)	百脉根茎坏死病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Lucerne Australian latent virus (LALV)	澳洲紫花苜蓿潜病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Lucerne Australian symptomless virus (LASV)	澳洲紫花苜蓿无症病毒		*Sadwavirus*
Lucerne enation virus (LEV)	紫花苜蓿耳突病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Lucerne transient streak virus (LTSV)	紫花苜蓿暂时性线条病毒		*Sobemovirus*
Lupin leaf curl virus (LLCuV)	羽扇豆曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Lupin yellow vein virus (LYVV)	羽扇豆黄脉病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Lychnis ringspot virus (LRSV)	剪秋罗(属)环斑病毒		*Hordeivirus*
Lychnis symptomless virus (LycSLV)	剪秋罗无症病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Maclura mosaic virus (MacMV)	柘橙(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Macluravirus*
Macroptilium golden mosaic virus (MGMV)	大翼豆(属)金色花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Macrotyloma mosaic virus (MaMV)	硬皮豆(属)花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Maize chlorotic dwarf virus (MCDV)	玉米褪绿矮缩病毒	*Sequiviridae*	*Waikavirus*
Maize chlorotic mottle virus (MCMV)	玉米褪绿斑驳病毒	*Tombusviridae*	*Machlomovirus*
Maize dwarf mosaic virus (MDMV)	玉米矮花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Maize mosaic virus (MMV)	玉米花叶病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Maize rayado fino virus (MRFV)	玉米细条病毒	*Tymoviridae*	*Marafivirus*
Maize rough dwarf virus (MRDV)	玉米粗缩病毒	*Reoviridae*	*Fijivirus*
Maize sterile stunt virus (MSSV)	玉米不育矮化病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Maize streak virus (MSV)	玉米线条病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Maize stripe virus (MSpV)	玉米条纹病毒		*Tenuivirus*
Maize white line mosaic virus (MWLMV)	玉米白线花叶病毒		(尚未归类)
Malva silvestris virus (MaSV)	锦葵病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Malva vein clearing virus (MVCV)	锦葵明脉病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Malva veinal necrosis virus (MVNV)	锦葵(属)脉坏死病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Malvaceous chlorosis virus (MCV)	拟锦葵褪绿病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Maracuja mosaic virus (MarMV)	鸡蛋果花叶病毒		*Tobamovirus*
Marigold mottle virus (MaMoV)	万寿菊斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Megakepasma mosaic virus (MegMV)	巨托雨树花叶病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Melandrium yellow fleck virus (MYFV)	女娄菜黄斑病毒	*Bromoviridae*	*Bromovirus*
Melilotus latent virus (MeLV)	草木樨(属)潜病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Melilotus mosaic virus (MeMV)	草木樨(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Melon leaf curl virus (MLCV)	甜瓜曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Melon necrotic spot virus (MNSV)	甜瓜坏死斑病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Melon rugose mosaic virus (MRMV)	甜瓜粗缩花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Melon variegation virus (MVV)	甜瓜杂色病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Melon vein-banding mosaic virus (MVBMV)	甜瓜镶脉花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Mexican papita viroid (MPVd)	墨西哥心叶茄类病毒	*Pospiviroidae*	*Pospiviroid*
Mibuna temperate virus (MTV)	水菜和性病毒	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Milk vetch dwarf virus (MDV)	紫云英矮缩病毒	*Nanoviridae*	*Nanovirus*
Mimosa bacilliform virus (MBV)	含羞草杆状病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Mirabilis mosaic virus (MiMV)	紫茉莉(属)花叶病毒	*Caulimoviridae*	*Caulimovirus*
Miscanthus streak virus (MiSV)	芒(属)线条病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Molinia streak virus (MoSV)	莫利亚草线条病毒	*Tombusviridae*	*Panicovirus*
Moroccan pepper virus (MPV)	摩洛哥辣椒病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Moroccan watermelon mosaic virus (MWMV)	摩洛哥西瓜花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Mulberry latent virus (MLV)	桑潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Mulberry ringspot virus (MRSV)	桑环斑病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Mungbean mosaic virus (MbMV)	绿豆花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Mungbean mottle virus (MMoV)	绿豆斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Mungbean yellow mosaic virus (MYMV)	绿豆黄花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Muskmelon vein necrosis virus (MuVNV)	香甜瓜脉坏死病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Myrobalan latent ringspot virus (MLRSV)	樱桃李潜环斑病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Nandina mosaic virus (NaMV)	南天竹(属)花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Nandina stem pitting virus (NSPV)	南天竹(属)茎痘病毒	*Flexiviridae*	*Capillovirus*
Narcissus degeneration virus (NDV)	水仙退化病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Narcissus late season yellows virus (NLSYV)	水仙晚期黄化病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Narcissus latent virus (NLV)	水仙潜病毒	*Potyviridae*	*Macluravirus*
Narcissus mosaic virus (NMV)	水仙花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Narcissus tip necrosis virus (NTNV)	水仙死顶病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Narcissus yellow stripe virus (NYSV)	水仙黄条病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Neckar river virus (NRV)	内卡河(德国)病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Negro coffee mosaic virus (NeCMV)	黑咖啡花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Nerine latent virus (NeLV)	尼润(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Nerine virus(NV)	尼润(属)病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Nerine virus X (NVX)	尼润(属)X 病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Nerine virus Y (NVY)	尼润 Y 病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Nerine yellow stripe virus (NeYSV)	尼润黄色条纹病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Nicotiana glutinosa stunt viroid (NGSVd)	心叶烟矮化类病毒	*Viroid*	(尚未归类)
Nicotiana velutina mosaic virus (NVMV)	绒毛烟花叶病毒		(尚未归类)
Northern cereal mosaic virus (NCMV)	北方禾谷花叶病毒	*Rhabdoviridae*	*Cytorhabdovirus*
Nothoscordum mosaic virus (NoMV)	假葱(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Oat blue dwarf virus (OBDV)	燕麦蓝矮病毒	*Tymoviridae*	*Marafivirus*
Oat chlorotic stunt virus (OCSV)	燕麦褪绿矮化病毒	*Tombusviridae*	*Avenavirus*
Oat golden stripe virus (OGSV)	燕麦金色条纹病毒		*Furovirus*
Oat mosaic virus (OMV)	燕麦花叶病毒	*Potyviridae*	*Bymovirus*
Oat necrotic mottle virus (ONMV)	燕麦坏死斑驳病毒	*Potyviridae*	*Rymovirus*
Oat sterile dwarf virus (OSDV)	燕麦不孕矮缩病毒	*Reoviridae*	*Fijivirus*
Oat striate mosaic virus (OSMV)	燕麦条点花叶病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Obuda pepper virus (ObPV)	奥布达辣椒病毒		*Tobamovirus*
Odontoglossum ringspot virus (ORSV)	齿瓣兰(属)环斑病毒		*Tobamovirus*
Okra leaf curl virus (OLCV)	秋葵曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Okra mosaic virus (OkMV)	秋葵花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Olive latent virus 1 (OLV-1)	油橄榄潜 1 号病毒	*Comoviridae*	*Sobemovirus*
Olive latent virus 2 (OLV-2)	油橄榄潜 2 号病毒	*Tombusviridae*	*Ourmiavirus*
Olive latent ringspot virus (OLRSV)	油橄榄潜隐环斑病毒	*Bromoviridae*	*Nepovirus*
Onion mite-borne latent virus (OMbLV)	洋葱螨传潜病毒	*Flexiviridae*	*Allexivirus*
Onion yellow dwarf virus (OYDV)	洋葱黄矮病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Ononis yellow mosaic virus (OYMV)	芒柄花(属)黄花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Orchid fleck virus (OFV)	兰花斑点病毒	*Rhabdoviridae*	(尚未归类)
Ornithogalum mosaic virus (OrMV)	虎眼万年青花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Ourmia melon virus (OuMV)	欧尔密甜瓜病毒		*Ourmiavirus*
Palm mosaic virus (PalMV)	棕榈花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Pangola stunt virus (PaSV)	马唐(属)矮化病毒	*Reoviridae*	*Fijivirus*
Panicum mosaic virus (PMV)	黍花叶病毒	*Tombusviridae*	*Panicovirus*
Panicum streak virus (PanSV)	黍线条病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Papaya leaf curl virus (PaLCV)	木瓜曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Papaya leaf distortion mosaic virus (PLDMV)	木瓜叶畸形花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Papaya mosaic virus (PapMV)	木瓜花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Papaya ringspot virus (PRSV)	木瓜环斑病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Paprika mild mottle virus (PaMMV)	红辣椒轻型斑驳病毒		*Tobamovirus*
Parietaria mottle virus (PMoV)	墙草(属)斑驳病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Parsley latent virus (PaLV)	欧芹潜隐病毒		(尚未归类)
Parsley virus (PaV)	欧芹病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Parsley virus 5 (PaV-5)	欧芹病毒 5 号	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Parsnip mosaic virus (ParMV)	欧防风花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Parsnip virus 3 (ParV-3)	欧防风病毒 3 号	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Parsnip virus 5 (ParV-5)	欧防风病毒 5 号	*Flexiviridae*	*Potexvirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Parsnip yellow fleck virus (PYFV)	欧防风黄点病毒	*Sequiviridae*	*Sequivirus*
Paspalum striate mosaic virus (PSMV)	雀稗(属)条点花叶病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Passiflora latent virus (PLV)	西番莲(属)潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Passion fruit mottle virus (PFMoV)	鸡蛋果斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Passion fruit ringspot virus (PFRSV)	鸡蛋果环斑病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Passion fruit woodiness virus (PWV)	鸡蛋果木质化病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV)	鸡蛋果黄花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Patchouli mild mosaic virus (PatMMV)	广藿香轻型花叶病毒	*Comoviridae*	*Fabavirus*
Patchouli mottle virus (PatMoV)	广藿香斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Patchouli virus X (PatVX)	广藿香 X 病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Pea early browning virus (PEBV)	豌豆早枯(褐)病毒		*Tobravirus*
Pea enation mosaic virus 1 (PEMV-1)	豌豆耳突花叶病毒 1 号	*Luteoviridae*	*Enamovirus*
Pea enation mosaic virus 2 (PEMV-2)	豌豆耳突花叶病毒 2 号		*Umbravirus*
Pea green mottle virus (PGMV)	豌豆绿色斑驳病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Pea mild mosaic virus (PMiMV)	豌豆轻型花叶病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Pea seed-borne mosaic virus (PSbVM)	豌豆种传花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Pea streak virus (PeSV)	豌豆线条病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Peach latent mosaic virus (PLMVd)	桃潜隐花叶类病毒	*Avsunviroidae*	*Pelamoviroid*
Peach rosette mosaic virus (PRMV)	桃丛簇花叶病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Peanut chlorotic streak virus (PCSV)	花生褪绿线条病毒	*Caulimoviridae*	*Soymovirus*
Peanut clump virus (PCV)	花生丛簇病毒		*Pecluvirus*
Peanut green mottle virus (PeGMoV)	花生绿斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Peanut mottle virus (PeMoV)	花生斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Peanut stunt virus (PSV)	花生矮化病毒	*Bromoviridae*	*Cucumovirus*
Peanut yellow mosaic virus (PeYMV)	花生黄花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Pear blister canker viroid (PBCVd)	梨疱状溃疡类病毒	*Pospiviroidae*	*Apscaviroid*
Pecteilis mosaic virus (PcMV)	白蝶兰(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Pelargonium flower break virus (PFBV)	天竺葵花碎锦病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Pelargonium leaf curl virus (PLCV)	天竺葵曲叶病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Pelargonium zonate spot virus (PZSV)	天竺葵环纹斑(带斑)病毒		(尚未归类)
Pepino mosaic virus (PepMV)	柏平缕瓜花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Pepper huasteco virus (PHV)	瓦斯蒂克辣椒病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Pepper leaf curl virus (PepLCV)	辣椒曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Pepper mild mosaic virus (PMMV)	辣椒轻型花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	辣椒轻型斑驳病毒		*Tobamovirus*
Pepper mild tigre virus (PepMTV)	辣椒轻型虎斑病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Pepper mottle virus (PepMoV)	辣椒斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Pepper ringspot virus (PepRSV)	辣椒环斑病毒		*Tobravirus*
Pepper severe mosaic virus (PepSMV)	辣椒重型花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Pepper vein banding virus (PVBV)	辣椒镶脉病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Pepper veinal mottle virus (PVMV)	辣椒脉斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Perilla mottle virus (PerMoV)	紫苏斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Peru tomato mosaic virus (PTV)	秘鲁番茄花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Petunia asteroid mosaic virus (PeAMV)	碧冬茄(属)星状花叶病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Petunia flower mottle virus (PetFMV)	矮牵牛花斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Petunia vein clearing virus (PVCV)	碧冬茄脉明病毒	*Caulimoviridae*	*Petuvirus*
Phalaenopsis chlorotic spot virus (PhCSV)	蝶兰(属)褪绿斑病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Physalis mottle virus (PhyMV)	酸浆花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Physalis severe mottle virus (PhySMV)	酸浆重斑驳病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*
Pigeon pea mosaic mottle viroid (PPMMoVd)	木豆花叶斑驳类病毒	*Viroid*	(尚未归类)
Pigeon pea proliferation virus(PPPV)	木豆簇生病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Pineapple bacilliform virus (PBV)	菠萝杆状病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Pineapple chlorotic leaf streak virus (PCLSV)	菠萝褪绿叶线条病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 (PMWaV-1)	菠萝粉蚧萎凋伴随病毒1号	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 (PMWaV-2)	菠萝粉蚧萎凋伴随病毒2号	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Piper yellow mottle virus (PYMoV)	胡椒(属)黄化斑驳病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Pisum virus (PisV)	豌豆(属)病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Plantago asiatica mosaic virus (PlAMV)	亚洲车前草花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Plantago mottle virus (PlMoV)	车前草斑驳病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Plantago severe mottle virus (PlSMoV)	车前草重型斑驳病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Plantago virus 4 (PlV-4)	车前草(属)病毒4号	*Caulimoviridae*	*Caulimovirus*
Plantain mottle virus (PlMV)	车前草斑驳病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Plantain virus 6 (PlV-6)	车前草病毒6号	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Plantain virus7 (PlV-7)	车前草病毒7号	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Plantain virus 8 (PlV-8)	车前草病毒8号	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Plantain virus X (PlVX)	车前草X病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Pleioblastus mosaic virus (PleMV)	奎诺苦竹花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Plum pox virus (PPV)	李痘病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Poa semilatent virus (PSLV)	早熟禾半潜病毒		*Hordeivirus*
Poinsettia cryptic virus (PnCV)	一品红隐潜病毒	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Poinsettia mosaic virus (PnMV)	一品红花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Pokeweed mosaic virus (PkMV)	商陆花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Poplar decline virus(PopDV)	杨树衰退病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Poplar mosaic virus (PopMV)	杨树花叶病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Potato aucuba mosaic virus (PAMV)	马铃薯奥古巴花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Potato black ringspot virus (PBRSV)	马铃薯黑环斑病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Potato leafroll virus (PLRV)	马铃薯卷叶病毒	*Luteoviridae*	*Polerovirus*
Potato mop-top virus (PMTV)	马铃薯帚顶病毒		*Pomovirus*
Potato spindle tuber viroid (PSTVd)	马铃薯纺锤形块茎类病毒	*Pospiviroidae*	*Pospiviroid*
Potato virus A (PVA)	马铃薯 A 病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Potato virus M (PVM)	马铃薯 M 病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Potato virus S (PVS)	马铃薯 S 病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Potato virus T (PVT)	马铃薯 T 病毒	*Flexiviridae*	*Trichovirus*
Potato virus U (PVU)	马铃薯 U 病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Potato virus V (PVV)	马铃薯 V 病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Potato virus X (PVX)	马铃薯 X 病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Potato virus Y (PVY)	马铃薯 Y 病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Potato yellow dwarf virus (PYDV)	马铃薯黄矮病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Potato yellow mosaic virus (PYMV)	马铃薯黄花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Pothos latent virus (PoLV)	绿萝潜隐病毒	*Tombusviridae*	*Aureusvirus*
Primula mosaic virus (PrMV)	报春花(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Primula mottle virus (PrMoV)	报春花斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Prune dwarf virus (PDV)	洋李矮缩病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)	李坏死环斑病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Prunus virus S (PruVS)	李(属)S 病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Pseuderanthemum yellow vein virus (PYVV)	山壳骨(属)黄脉病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Quail pea mosaic virus (QPMV)	鹑豌豆花叶病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Radish mosaic virus (RaMV)	萝卜花叶病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Radish vein clearing virus (RaVCV)	萝卜明脉病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Radish yellow edge virus (RYEV)	萝卜黄边病毒	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Ranunculus mottle virus (RanMoV)	毛茛(属)斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Ranunculus repens symptomless virus (RaRSV)	匍枝毛茛无症病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Ranunculus white mottle virus (RWMV)	匍枝毛茛白斑驳病毒	*Ophioviridae*	*Ophiovirus*
Raphanus virus (RaV)	萝卜(属)病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)	悬钩子丛矮病毒		*Idaeovirus*
Raspberry ringspot virus (RpRSV)	悬钩子环斑病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Raspberry vein chlorosis virus (RVCV)	悬钩子脉褪绿病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Red clover cryptic virus 2 (RCCV-2)	红三叶草潜隐病毒 2 号	*Partitiviridae*	*Betacryptovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Red clover mosaic virus (RCMV)	红三叶草花叶病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Red clover mottle virus (RCMoV)	红三叶草斑驳病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV)	红三叶草坏死花叶病毒	*Tombusviridae*	*Dianthovirus*
Red clover vein mosaic virus (RCVMV)	红三叶草脉花叶病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Red pepper cryptic virus 1 (RPCV-1)	红辣椒隐潜病毒 1 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Red pepper cryptic virus 2 (RPCV-2)	红辣椒隐潜病毒 2 号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Rembrandt tulip breaking virus (ReTBV)	伦布兰特郁金香碎色病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Rhododendron necrotic ringspot virus (RoNRSV)	杜鹃花坏死环斑病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Rhubarb temperate virus (RTV)	大黄和性病毒	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Rhubarb virus 1 (RV-1)	大黄病毒 1 号	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Rhynchosia mosaic virus (RhMV)	鹿藿(属)花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Ribgrass mosaic virus (RMV)	长叶车前花叶病毒		*Tobamovirus*
Rice black streaked dwarf virus (RBSDV)	水稻黑条矮缩病毒	*Reoviridae*	*Fijivirus*
Rice dwarf virus (RDV)	水稻矮缩病毒	*Reoviridae*	*Phytoreovirus*
Rice gall dwarf virus (RGDV)	水稻瘤矮病毒	*Reoviridae*	*Phytoreovirus*
Rice grassy stunt virus (RGSV)	水稻草状矮化病毒		*Tenuivirus*
Rice hoja blanca virus (RHBV)	水稻白叶病毒		*Tenuivirus*
Rice necrosis mosaic virus (RNMV)	水稻坏死花叶病毒	*Potyviridae*	*Bymovirus*
Rice ragged stunt virus (RRSV)	水稻齿矮病毒	*Reoviridae*	*Oryzavirus*
Rice stripe necrosis virus (RSNV)	水稻条纹坏死病毒		*Furovirus*
Rice stripe virus (RSV)	水稻条纹病毒		*Tenuivirus*
Rice tungro bacilliform virus (RTBV)	水稻东格鲁杆状病毒	*Caulimoviridae*	*Tungrovirus*
Rice tungro spherical virus (RTSV)	水稻东格鲁球状病毒	*Sequiviridae*	*Waikavirus*
Rice wilted stunt virus (RWSV)	水稻萎蔫矮化病毒		*Tenuivirus*
Rice yellow mottle virus (RYMV)	水稻黄斑驳病毒		*Sobemovirus*
Rice yellow stunt virus (RYSV)	水稻黄矮病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Rubus Chinese seed-borne virus (RCSV)	中国悬钩子种传病毒		*Sadwavirus*
Rudbeckia mosaic virus (RuMV)	金光菊(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Rupestris stem pitting-associated virus (RSPaV)	岩生葡萄茎痘伴随病毒	*Flexiviridae*	*Foveavirus*
Ryegrass cryptic virus (RGCV)	黑麦草隐潜病毒	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Ryegrass mosaic virus (RGMV)	黑麦草花叶病毒	*Potyviridae*	*Rymovirus*
Saguaro cactus virus (SgCV)	萨瓜罗仙人掌病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Sainpaulia leaf necrosis virus (SLNV)	非洲紫罗兰(属)叶坏死病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Sambucus vein clearing virus (SVCV)	接骨木(属)脉明病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Sammons's Opuntia virus (SOV)	萨蒙氏仙人掌病毒		*Tobamovirus*
Santosai temperate virus (STV)	圣图塞芜菁和性病毒	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Sarracenia purpurea virus (SPV)	瓶子草病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Satsuma dwarf virus (SDV)	温州蜜柑矮缩病毒		*Sadwavirus*
Schefflera ringspot virus (SRV)	鹅掌柴(属)环斑病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Scrophularia mottle virus (ScrMV)	玄参(属)斑驳病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Serrano golden mosaic virus (SGMV)	塞拉诺金色花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Shallot latent virus (SLV)	火葱潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Shallot mite-borne latent virus (ShMbLV)	火葱螨传潜病毒	*Flexiviridae*	*Allexivirus*
Shallot virus X (ShVX)	火葱 X 病毒	*Flexiviridae*	*Allexivirus*
Shallot yellow stripe virus (SYSV)	火葱黄色条纹病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Sida golden mosaic virus (SiGMV)	黄花稔(属)金色花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Sida yellow vein virus (SiYVV)	黄花稔(属)黄脉病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Sinaloa tomato leaf curl virus (STLCV)	锡那罗番茄曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Sint-Jem's onion latent virus (SJOLV)	辛章山洋葱潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Sitke water-borne virus (SWBV)	锡特卡河水传病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Smithiantha latent virus (SmiLV)	庙铃苣苔(属)病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Soil-borne rye mosaic virus (SBRMV)	土传黑麦花叶病毒		*Furovirus*
Soil-borne wheat mosaic virus (SBWMV)	土传小麦花叶病毒		*Furovirus*
Solanum apical leaf curl virus (SALCV)	茄(属)顶曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Solanum nodiflorum mottle virus (SNMoV)	莨菪斑驳病毒		*Sobemovirus*
Solanum tomato leaf curl virus (SToLCV)	茄属番茄曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Solanum yellow leaf curl virus (SYLCV)	茄(属)黄化曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Sonchus mottle virus (SMoV)	苦苣菜(属)斑驳病毒	*Caulimoviridae*	*Caulimovirus*
Sonchus yellow net virus (SYNV)	苦苣菜(属)黄网病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Sonchus virus (SonV)	苦苣菜(属)病毒	*Rhabdoviridae*	*Cytorhabdovirus*
Sorghum chlorotic spot virus (SgCSV)	高粱(属)褪绿斑病毒		*Furovirus*
Sorghum mosaic virus (SrMV)	高粱(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Sorghum virus (SrV)	高粱弹状病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Soursop yellow blotch virus (SYBV)	刺果番荔枝黄斑病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
South African cassava mosaic virus (SACMV)	南非木薯花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Southern bean mosaic virus (SBMV)	南方菜豆花叶病毒		*Sobemovirus*
Southern cowpea mosaic virus (SCPMV)	南方豇豆花叶病毒		*Sobemovirus*
Southern potato latent virus (SoPLV)	南方马铃薯潜病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Sowbane mosaic virus (SoMV)	藜草花叶病毒		*Sobemovirus*
Sowthistle yellow vein virus (SYVV)	苦苣菜黄脉病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Soybean chlorotic mottle virus (SbCMV)	大豆褪绿斑驳病毒	*Caulimoviridae*	*Soymovirus*
Soybean crinkle leaf virus (SbCLV)	大豆皱叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Soybean dwarf virus (SbDV)	大豆矮缩病毒	*Luteoviridae*	*Luteovirus*
Soybean mosaic virus (SMV)	大豆花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Spartina mottle virus (SpMoV)	大米草斑驳病毒	*Potyviridae*	*Rymovirus*
Spinach latent virus (SpLV)	菠菜潜隐病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Spinach temperate virus (SpTV)	菠菜和性病毒	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Spring beauty latent virus (SBLV)	春美草潜病毒	*Bromoviridae*	*Bromovirus*
Squash leaf curl China virus (SLCCNV)	中国南瓜曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Squash leaf curl virus (SLCV)	南瓜曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Squash mosaic virus (SqMV)	南瓜花叶病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Sri Lankan passion fruit mottle virus (SLPMoV)	斯利兰卡西番莲斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Strawberry crinkle virus (SCV)	草莓皱缩病毒	*Rhabdoviridae*	*Cytorhabdovirus*
Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)	草莓潜环斑病毒		*Sadwavirus*
Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV)	草莓轻型黄边病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Strawberry mottle virus (SMoV)	草莓斑驳病毒		*Sadwavirus*
Strawberry pseudo mild yellow edge virus (SPMYEV)	草莓伪轻型黄边病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
Strawberry vein banding virus (SVBV)	草莓镶脉病毒	*Caulimoviridae*	*Caulimovirus*
Subterranean clover mottle virus (SCMoV)	地三叶草斑驳病毒		*Sobemovirus*
Subterranean clover stunt virus (SCSV)	地三叶草矮化病毒	*Nanoviridae*	*Nanovirus*
Sugarcane bacilliform virus (SCBV)	甘蔗杆状病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Sugarcane mild mosaic virus (SMMV)	甘蔗轻型花叶病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Sugarcane mosaic virus (SCMV)	甘蔗花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Sugarcane streak virus (SSV)	甘蔗线条病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Sugarcane yellow leaf virus (ScYLV)	甘蔗黄叶病毒	*Luteoviridae*	*Polerovirus*
Sunflower crinkle virus (SuCV)	向日葵皱缩病毒		*Umbravirus*
Sunflower mosaic virus (SuMV)	向日葵花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Sunflower yellow blotch virus (SuYBV)	向日葵黄斑病毒		*Umbravirus*
Sunn-hemp mosaic virus (SHMV)	菽麻花叶病毒		*Tobamovirus*
Sweet clover necrotic mosaic virus (SCNMV)	草木樨坏死花叶病毒	*Tombusviridae*	*Dianthovirus*
Sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV)	甘薯褪绿矮化病毒	*Closteroviridae*	*Crinivirus*
Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV)	甘薯羽状斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Sweet potato latent virus (SPLV)	甘薯潜病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Sweet potato leaf speckling virus (SPLSV)	甘薯叶斑病毒	*Luteoviridae*	*Enamovirus*
Sweet potato mild mottle virus (SPMMV)	甘薯轻型斑驳病毒	*Potyviridae*	*Ipomovirus*
Sweet potato mild speckling virus (SPMSV)	甘薯轻型斑点病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Sweet potato vein mosaic virus (SPVMV)	甘薯脉花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Sweet potato yellow dwarf virus (SPYDV)	甘薯黄矮病毒	*Potyviridae*	*Ipomovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名
Sword bean distortion mosaic virus (SBDMV)	剑豆畸变花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Taino tomato mottle virus (TToMoV)	泰诺番茄斑驳病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tamarillo mosaic virus (TamMV)	树番茄花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tamus red mosaic virus (TRMV)	达马薯蓣红花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Taro bacilliform virus (TaBV)	芋杆状病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Taro feathery mottle virus (TFMoV)	芋羽状斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Teasel mosaic virus (TeaMV)	川续断(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Telfairia mosaic virus (TeMV)	发藤葫芦(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tephrosia symptomless virus (TeSV)	灰毛豆(属)无症病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Thistle mottle virus (ThMoV)	蓟斑驳病毒	*Caulimoviridae*	*Caulimovirus*
Tobacco bushy top virus (TBTV)	烟草丛顶病毒		*Umbravirus*
Tobacco etch virus (TEV)	烟草蚀纹病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tobacco leaf curl virus (TLCV)	烟草曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV)	烟草轻型绿花叶病毒		*Tobamovirus*
Tobacco mosaic virus (TMV)	烟草花叶病毒		*Tobamovirus*
Tobacco mottle virus (TMoV)	烟草斑驳病毒		*Umbravirus*
Tobacco necrosis virus A (TNV-A)	烟草坏死 A 病毒	*Tombusviridae*	*Necrovirus*
Tobacco necrosis virus D (TNV-D)	烟草坏死 D 病毒	*Tombusviridae*	*Necrovirus*
Tobacco necrotic dwarf virus (TNDV)	烟草坏死矮缩病毒	*Luteoviridae*	*Enamovirus*
Tobacco rattle virus (TRV)	烟草脆裂病毒		*Tobravirus*
Tobacco ringspot virus (TRSV)	烟草环斑病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Tobacco streak virus (TSV)	烟草线条病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Tobacco stunt virus (TStV)	烟草矮化病毒		*Varicosavirus*
Tobacco vein banding mosaic virus (TVBMV)	烟草镶脉花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tobacco vein clearing virus (TVCV)	烟草明脉病毒	*Caulimoviridae*	*Cavemovirus*
Tobacco vein mottling virus (TVMV)	烟草脉斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tobacco wilt virus (TWV)	烟草萎蔫病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tobacco yellow dwarf virus (TYDV)	烟草黄矮病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Tobacco yellow vein virus (TYVV)	烟草黄脉病毒		*Umbravirus*
Tomato apical stunt viroid (TASVd)	番茄顶缩类病毒	*Pospiviroidae*	*Pospiviroid*
Tomato aspermy virus (TAV)	番茄不孕病毒	*Bromoviridae*	*Cucumovirus*
Tomato black ring virus (TBRV)	番茄黑环病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Tomato bunchy top viroid (ToBTVd)	番茄束顶类病毒	Viroid	(尚未归类)
Tomato bushy stunt virus (TBSV)	番茄丛矮病毒	*Tombusviridae*	*Tombusvirus*
Tomato chlorosis virus (ToCV)	番茄褪绿病毒	*Closteroviridae*	*Crinivirus*
Tomato chlorotic spot virus (TCSV)	番茄褪绿斑病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名
Tomato golden mosaic virus (TGMV)	番茄金色花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato infectious chlorosis virus (TICV)	番茄传染性褪绿病毒	*Closteroviridae*	*Crinivirus*
Tomato leaf curl virus (ToLCV)	番茄曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato leaf curl Bangalore virus (ToLCV)	班加罗尔番茄曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV)	新德里番茄曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato leaf curl Taiwan virus (ToLCTwV)	台湾番茄曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato leafroll virus (TLRV)	番茄卷叶病毒	*Geminiviridae*	*Curtovirus*
Tomato mosaic virus (ToMV)	番茄花叶病毒		*Tobamovirus*
Tomato mottle virus (ToMoV)	番茄斑驳病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato planta macho viroid (TPMVd)	番茄雄性株类病毒	*Pospiviroidae*	*Pospiviroid*
Tomato pseudo curly top virus (TPCTV)	番茄伪曲顶病毒	*Geminiviridae*	*Curtovirus*
Tomato ringspot virus (ToRSV)	番茄环斑病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Tomato severe leaf curl virus (ToSLCV)	番茄严重曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	番茄斑萎病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*
Tomato top necrosis virus (ToTNV)	番茄顶坏死病毒	*Comoviridae*	*Nepovirus*
Tomato yellow dwarf virus (ToYDV)	番茄黄矮病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	番茄黄曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCNV)	中国番茄黄曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV)	撒丁岛番茄黄曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato yellow leaf curl Thailand virus (TYLCTHV)	泰国番茄黄曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato yellow mosaic virus (ToYMV)	番茄黄花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato yellow mottle virus (ToYMoV)	番茄黄斑驳病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV)	番茄黄脉条纹病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Tongan vanilla virus (TVV)	同甘香果兰病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tradescantia mosaic virus (TraMV)	紫露草花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Trichosanthes mottle virus (TrMoV)	栝楼(属)斑驳病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Triticum aestivum chlorotic spot virus (TACSV)	普通小麦褪绿斑病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Tropaeolum mosaic virus (TrMV)	旱金莲(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tropaeolum virus 1 (TV-1)	旱金莲(属)病毒1号	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tropaeolum virus 2 (TV-2)	旱金莲(属)病毒2号	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tuberose mild mosaic virus (TuMMV)	晚香玉轻型花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tulare apple mosaic virus (TAMV)	杜拉苹果花叶病毒	*Bromoviridae*	*Ilarvirus*
Tulip band breaking virus (TBBV)	郁金香带状碎色病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tulip breaking virus (TBV)	郁金香碎色病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Tulip mild mottle mosaic virus (TMMMV)	郁金香轻型斑驳花叶病毒	*Ophioviridae*	*Ophiovirus*
Tulip virus X (TVX)	郁金香X病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
Turnip crinkle virus (TCV)	芜菁皱缩病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Turnip mosaic virus (TuMV)	芜菁花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Turnip rosette virus (TRoV)	芜菁丛簇病毒		*Sobemovirus*
Turnip vein-clearing virus (TVCV)	芜菁明脉病毒		*Tobamovirus*
Turnip yellow mosaic virus (TYMV)	芜菁黄花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Ullucus mild mottle virus (UMMV)	块根落葵(属)轻型斑驳病毒		*Tobamovirus*
Ullucus mosaic virus (UMV)	块根落葵(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Ullucus virus C (UVC)	块根落葵(属)C病毒	*Comoviridae*	*Comovirus*
Urochloa hoja blanca virus (UHBV)	尾稃草白叶病毒		*Tenuivirus*
Vallota mosaic virus (ValMV)	石蒜花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Vanilla mosaic virus (VanMV)	香果兰花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Velvet tobacco mottle virus (VTMoV)	绒毛烟斑驳病毒		*Sobemovirus*
Vicia cryptic virus (VCV)	野豌豆潜隐病毒	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
Vigna sinensis mosaic virus (VSMV)	豇豆花叶病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Viola mottle virus (VMoV)	堇菜(属)斑驳病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
Voandzeia necrotic mosaic virus (VNMV)	沃安齐贾(属)坏死花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Watercress yellow spot virus (WYSV)	水田芥黄斑病毒		(尚未归类)
Watermelon bud necrosis virus (WBNV)	西瓜芽坏死病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*
Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV)	西瓜褪绿矮化病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Watermelon curly mottle virus (WmCMV)	西瓜卷曲斑驳病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Watermelon mosaic virus (WMV)	西瓜花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Watermelon silver mottle virus (WSMOV)	西瓜银色斑驳病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*
Weddel waterborne virus (WWBV)	韦德尔水传病毒	*Tombusviridae*	*Carmovirus*
Wheat American striate mosaic virus (WASMV)	美洲小麦条点花叶病毒	*Rhabdoviridae*	*Cytorhabdovirus*
Wheat chlorotic streak virus (WCSV)	小麦褪绿条纹病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Wheat dwarf virus (WDV)	小麦矮缩病毒	*Geminiviridae*	*Mastrevirus*
Wheat rosette stunt virus (WRSV)	小麦丛簇矮化病毒	*Rhabdoviridae*	*Nuckorhabdovirus*
Wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV)	小麦梭条花叶病毒	*Potyviridae*	*Bymovirus*
Wheat streak mosaic virus (WSMV)	小麦线条花叶病毒	*Potyviridae*	*Tritimovirus*
Wheat yellow leaf virus (WYLV)	小麦黄叶病毒	*Closteroviridae*	*Closterovirus*
Wheat yellow mosaic virus (WYMV)	小麦黄花叶病毒	*Potyviridae*	*Bymovirus*
White bryony mosaic virus (WBMV)	白泻根花叶病毒	*Flexiviridae*	*Carlavirus*
White bryony virus (WBV)	白泻根病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
White clover cryptic virus 1 (WCCV-1)	白三叶草病毒1号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*
White clover cryptic virus 2 (WCCV-2)	白三叶草病毒2号	*Partitiviridae*	*Betacryptovirus*
White clover cryptic virus 3 (WCCV-3)	白三叶草病毒3号	*Partitiviridae*	*Alphacryptovirus*

续表

植物病毒名称(缩写)	中文译名	科名	属名*
White clover mosaic virus (WClMV)	白三叶草花叶病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*
White clover virus L (WClVL)	白三叶草L病毒		(尚未归类)
Wild cucumber mosaic virus (WCMV)	野黄瓜花叶病毒	*Tymoviridae*	*Tymovirus*
Wild potato mosaic virus (WPMV)	野马铃薯花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Winter wheat mosaic virus (WWMV)	冬小麦花叶病毒		*Tenuivirus*
Winter wheat Russian mosaic virus (WWRMV)	俄罗斯冬小麦花叶病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Wissadula golden mosaic virus (WGMV)	隔蒴苘(属)金色花叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Wisteria vein mosaic virus (WVMV)	紫藤(属)脉花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Wound tumor virus (WTV)	伤瘤病毒	*Reoviridae*	*Phytoreovirus*
Yam mosaic virus (YMV)	薯蓣花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Youcai mosaic virus (YoMV)	油菜花叶病毒		*Tobamovirus*
Yucca bacilliform virus (YBV)	丝兰杆状病毒	*Caulimoviridae*	*Badnavirus*
Zea mays virus (ZMV)	玉米弹状病毒	*Rhabdoviridae*	*Nucleorhabdovirus*
Zea mosaic virus (ZeMV)	玉米属花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Zinnia leaf curl virus (ZiLCV)	百日草曲叶病毒	*Geminiviridae*	*Begomovirus*
Zoysia mosaic virus (ZoMV)	结缕草(属)花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV)	小西葫芦绿斑驳花叶病毒		*Tobamovirus*
Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV)	小西葫芦致死褪绿病毒	*Bunyaviridae*	*Tospovirus*
Zucchini yellow fleck virus (ZYFV)	小西葫芦黄点病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	小西葫芦黄花叶病毒	*Potyviridae*	*Potyvirus*
Zygocactus symptomless virus (ZSLV)	蟹爪兰无症病毒	*Flexiviridae*	*Potexvirus*

* 尚未归类于科或属的病毒注为"尚未归类",只归到科但未定属的病毒列出病毒科名。各个病毒科、属的中文译名见附录2A和2C。

表 2　植物病毒名称中所用的植物名称缩写的差异

A 和 Ar 均可代表 artichoke（菊芋）
A 和 Ant 均可代表 *Anthoxanthum*（黄花茅属）
A 和 Ant 均可代表 *Anthriscus*（峨参属）
A 和 Ap（只用一次）均可代表 apple（苹果）
A 和 Aq 均可代表 *Aquilegia*（楼斗菜属）
B、Ba 和 Bar（只用一次）均可代表 barley（大麦）
B 和 Be（只用一次）均可代表 bean（菜豆）
B 和 Bt（只用一次）均可代表 beet（甜菜）
B 和 Bl 均可代表 blueberry（蓝莓、乌饭树）
C 和 Car（只用一次）均可代表 carnation［香石竹(康乃馨)］
C 和 Ct 均可代表 carrot（胡萝卜）
C 和 Cas 均可代表 *Cassia*（决明属）
C 和 Ch 均可代表 chicory（菊苣）
C 和 Ci 均可代表 citrus（柑橘）
C 和 Cl 均可代表 *Clitoria*（蝶豆属）
C 和 Co 均可代表 cocksfoot（鸭茅)［由于 Co 也可代表 coffee（咖啡）和 cole（芸薹属），因此以后用 Ck 可能较好］
C 和 Cp 均可代表 cowpea（豇豆）
C 和 Cu 均可代表 cucumber（黄瓜）
D 和 Des（只用一次）均可代表 *Desmodium*（山蚂蝗属）
D（只用一次）和 Di 均可代表 *Digitaria*（马唐属）
E（只用一次）和 Euo 均可代表 *Euonymus*（卫矛属）
F 和 Fre 均可代表 *Freesia*（香雪兰）
H 和 Hn（只用一次）均可代表 honeysuckle（忍冬）
H 和 Hp 均可代表 hop（啤酒花）
L 和 Lyc 均可代表 *Lychnis*（剪秋罗属）
M 和 Ma 均可代表 *Malva*（锦葵属）
M 和 Mb 均可代表 mungbean（绿豆）
N 和 Na（只用一次）均可代表 *Nandina*（南天竹属）
N 和 Ne（只用一次）均可代表 *Nerine*（尼润属）
P 和 Pan（只用一次）均可代表 *Panicum*（黍属）
P、Pa 和 Pap（只用一次）均可代表 papaya（木瓜）
P（只用一次）和 Par 均可代表 parsnip（欧防风）
P（只用一次）和 PF 均可代表 passionfruit（鸡蛋果）
P 和 Pe（只用一次）均可代表 pea（豌豆）
P 和 Pe 均可代表 peanut（花生）
P 和 Pel 均可代表 *Pelagonium*（天竺葵）
P 和 Pep 均可代表 pepper（辣椒）
P 和 Pet 均可代表 *Petunia*（碧冬茄）
P 和 PP 均可代表 pigeon pea（木豆）
Pl 可代表 *Plantago*（车前草属）和 plantain（车前草）
P 和 Pop 均可代表 poplar（杨树）
P 和 Pru（只用一次）均可代表 *Prunus*（李属）
R（只用一次）和 Ra 均可代表 radish（萝卜）
R（只用一次）和 Ran（只用一次）均可代表 *Ranunculus*（毛茛属）
R 和 Rp（只用一次）均可代表 raspberry（悬钩子）
S 和 Sh 均可代表 shallot（火葱）
S 和 Son（只用一次）均可代表 *Sonchus*（苦苣菜属）
S 和 So（只用一次）均可代表 southern（南方）
S 和 Sb 均可代表 soybean（大豆）
S 和 Sq（只用一次）均可代表 squash（西葫芦）
T 和 To 均可代表 tomato（番茄）
T 和 Tra（只用一次）均可代表 *Tradescantia*（紫露草）
T 和 Tu（只用一次）均可代表 turnip（芜菁）
Wm 和 W 均可代表 watermelon（西瓜）

表 3　世界各国／地区英文名称及其标准代码

Afghanistan	AF	Comoros	KM
Albania	AL	Congo	CG
Algeria	DZ	Cook Islands	CK
American Samoa	AS	Costa Rica	CR
Andorra	AD	Cote d'Ivoire (Ivory Coast)	CI
Angola	AO	Croatia (Hrvatska)	HR
Anguilla	AI	Cuba	CU
Antarctica	AQ	Cyprus	CY
Antigua and Barbuda	AG	Czech Republic	CZ
Argentina	AR	Denmark	DK
Armenia	AM	Djibouti	DJ
Aruba	AW	Dominica	OM
Australia	AU	Dominican Republic	DO
Austria	AT	East Timor	TP
Azerbaijan	AZ	Ecuador	EC
Bahamas	BS	Egypt	EG
Bahrain	BH	El Salvador	SV
Bangladesh	BD	Equatorial Guinea	GO
Barbados	BB	Eritrea	ER
Belarus	BY	Estonia	EE
Belgium	BE	Ethiopia	ET
Belize	BZ	Falkland Islands (Malvinas)	FK
Benin	BJ	Faroe Islands	FO
Bermuda	BM	Fiji	FJ
Bhutan	BT	Finland	FI
Bolivia	BO	France	FR
Bosnia and Herzegovina	BA	France, Metropolitan	FX
Botswana	EW	French Guiana	GF
Bouvet Island	BV	French Polynesia	PF
Brazil	BR	French Southern Territories	TF
British Indian Ocean Territory	IO	Gabon	GA
Brunei Darussalam	BN	Gambia	GM
Bulgaria	BG	Georgia	GE
Burkina Faso	BF	Germany	DE
Burundi	BI	Ghana	GH
Cambodia	KH	Gibraltar	GI
Cameroon	CM	Greece	GR
Canada	CA	Greenland	GL
Cape Verde	CV	Grenada	GD
Cayman Islands	KY	Guadeloupe	GP
Central African Republic	CF	Guam	GU
Chad	TD	Guatemala	GT
Chile	CL	Guinea	GN
China	CN	Guinea-Bissau	GW
Christmas Island	CX	Guyana	GY
Cocos (Keeling Islands)	CC	Haiti	HT
Colombia	CO	Heard and McDonald Islands	HM

续表

Honduras	HN	Montserrat	MS
Hong Kong, China	HK	Morocco	MA
Hungary	HU	Mozambique	MZ
Iceland	IS	Myanmar	MM
India	IN	Namibia	NA
Indonesia	ID	Nauru	NR
Iran	IR	Nepal	NP
Iraq	IQ	Netherlands	NL
Ireland	IE	Netherlands Antilles	AN
Israel	IL	New Caledonia	NC
Italy	IT	New Zealand	NZ
Jamaica	JM	Nicaragua	NI
Japan	JR	Niger	NE
Jordan	JO	Nigeria	NG
Kazakhstan	KZ	Niue	NU
Kenya	KE	Norfolk Island	NF
Kiribati	KI	Northern Mariana Islands	MR
Korea (North)	KP	Norway	NO
Korea (South)	KR	Oman	OM
Kuwait	KW	Pakistan	PK
Kyrgyzstan	KG	Palau	RW
Laos	LA	Panama	RA
Latvia	LV	Papua New Guinea	PG
Lebanon	LB	Paraguay	PY
Lesotho	LS	Peru	RE
Liberia	LR	Philippines	PH
Libya	LY	Pitcairn	PN
Liechtenstein	LI	Poland	PL
Lithuania	LT	Portugal	PT
Luxembourg	LU	Puerto Rico	PR
Macau, China	MO	Qatar	QA
Macedonia	MK	Reunion	RE
Madagascar	MG	Romania	RO
Malawi	MW	Russian Federation	RU
Malaysia	MY	Rwanda	RW
Maldives	MV	Saint Kitts and Nevis	KN
Mali	ML	Saint Lucia	LC
Malta	MT	Saint Vincent and The Grenadines	VC
Marshall Islands	MH	Samoa	WS
Martinique	MO	San Marino	SM
Mauritania	MR	Sao Tome and Principe	ST
Mauritius	MU	Saudi Arabia	SA
Mayotte	YT	Senegal	SN
Mexico	MX	Seychelles	SC
Micronesia	FM	Sierra Leone	SL
Moldova	MD	Singapore	SG
Monaco	MC	Slovak Republic	SK
Mongolia	MN	Slovenia	SI

续表

Solomon Islands	SB	Turkmenistan	TM
Somalia	SO	Turks and Caicos Islands	TC
South Africa	ZA	Tuvalu	TV
S. Georgia and S. Sandwich Islands	GS	Uganda	UG
Spain	ES	Ukraine	UA
Sri Lanka	LK	United Arab Emirates	AE
St. Helena	SH	United Kingdom	UK
St. Pierre and Miquelon	PM	United States	US
Sudan	SD	US Minor Outlying Islands	UM
Suriname	SR	Uruguay	UY
Svalbard and Jan Mayen Islands	SJ	Uzbekistan	UZ
Swaziland	SZ	Vanuatu	VU
Sweden	SE	Vatican City State (Holy City)	VA
Switzerland	CH	Venezuela	VE
Syria	SY	Vietnam	VN
Taiwan, China	TW	Virgin Islands (British)	VG
Tajikistan	TJ	Virgin Islands (US)	VI
Tanzania	TZ	Wallis and Futuna Islands	WF
Thailand	TH	Western Sahara	EH
Togo	TG	Yemen	YE
Tokelau	TK	Yugoslavia	YU
Tonga	TO	Zaire	ZR
Trinidad and Tobago	TT	Zambia	ZM
Tunisia	TN	Zimbabwe	ZW
Turkey	TR		

附录 1B

植物病毒名称缩写及其对应病毒标准名称

名称缩写	病毒名称	名称缩写	病毒名称
AARSV	*Artichoke Aegean ringspot virus*	APLPV	*American plum line pattern virus*
AbMV	*Abutilon mosaic virus*	APLV	*Andean potato latent virus*
AbYV	*Abutilon yellows virus*	ApMV	*Apple mosaic virus*
ABV	*Aglaonema bacilliform virus*	APMoV	*Andean potato mottle virus*
ACDV	Artichoke curly dwarf virus	AqNRSV	Aquilegia necrotic ringspot virus
ACLSV	*Apple chlorotic leafspot virus*	AREV	*Althea rosea enation virus*
ACMV	*African cassava mosaic virus*	ArjMV	*Araujia mosaic virus*
ACV-1	*Alfalfa cryptic virus 1*	ArLV	*Artichoke latent virus*
ACV-2	Alfalfa cryptic virus 2	ArLVM	Artichoke latent virus M
ADFVd	*Apple dimple fruit viroid*	ArLVS	Artichoke latent virus S
AFCVd	*Apple fruit crinkle viroid*	ArMV	*Arabis mosaic virus*
AGMV	*Asystasia golden mosaic virus*	ASBVd	*Avocado sunblotch viroid*
AGMoV	Asystasia gangetica mottle virus	ASGV	*Apple stem grooving virus*
AgMV	*Agropyron mosaic virus*	ASPV	*Apple stem pitting virus*
AGVd	*Australian grapevine viroid*	ASSVd	*Apple scar skin viroid*
AHLV	*American hop latent virus*	AtBV	Atropa belladonna virus
AILV	*Artichoke Italian latent virus*	AuBV	Aucuba bacilliform virus
ALBV	*Anthoxanthum latent blanching virus*	AV-1	*Asparagus virus 1*
AliMV	Amazon lily mosaic virus	AV-2	*Asparagus virus 2*
AlMV	*Alpinia mosaic virus*	AV-3	*Asparagus virus 3*
AlpMV	*Alpinia mosaic virus*	AVA	*Arracacha virus A*
AlStV	Alstroemeria streak virus	AVB	Arracacha virus B
AltMV	*Alternanthera mosaic virus*	AVBV	Artichoke vein banding virus
ALV	Arracacha latent virus	AVY	Arracacha virus Y
AMCV	*Artichoke mottled crinkle virus*	AYRSV	*Artichoke yellow ringspot virus*
AmLMV	*Amaranthus leaf mottle virus*	AWBV	*Ahlum waterborne virus*
AMV	*Alfalfa mosaic virusx*	AWSV	Alligatorweed stunting virus
AneMV	Aneilema mosaic virus	AYMV	*Acalypha yellow mosaic virus*
ANMV	Aquilegia necrotic mosaic virus	AYV	*Anthriscus yellows virus*
		AYVV	*Ageratum yellow vein virus*
		BaMMV	*Barley mild mosaic virus*
AntLV	Anthriscus latent virus	BaMV	*Bamboo mosaic virus*
AntMV	Anthoxanthum mosaic virus	BarV-B1	*Barley virus B1*

续表

名称缩写	病毒名称
BaSV	Bajra streak virus
BaYMV	*Barley yellow mosaic virus*
BBMV	*Broad bean mottle virus*
BBNV	*Broad bean necrosis virus*
BBrMV	*Banana bract mosaic virus*
BBSV	*Broad bean stain virus*
BBTMV	*Broad bean true mosaic virus*
BBTV	*Banana bunchy top virus*
BBWV-1	*Broad bean wilt virus 1*
BBWV-2	*Broad bean wilt virus 2*
BcaMV	*Bean calico mosaic virus*
BCMNV	*Bean common mosaic necrosis virus*
BCMV	*Bean common mosaic virus*
BCTV-Cal	*Beet curly top virus – California/Logan*
BCTV	*Beet curly top virus*
BCTV-CFH	*Beet curly top virus – Iran/CFH*
BCTV-Wor	*Beet curly top virus – Worland*
BCV-1	*Beet cryptic virus 1*
BCV-2	*Beet cryptic virus 2*
BCV-3	*Beet cryptic virus 3*
BDMV	*Bean dwarf mosaic virus*
BELV	*Bermuda grass etched-line virus*
BeMV	*Belladonna mottle virus*
BeYDV	*Bean yellow dwarf virus*
BGMV-Br	*Bean golden mosaic virus – Brazil*
BGMV-PR	*Bean golden mosaic virus – Puerto Rico*
BiMoV	*Bidens mottle virus*
BiMV	Bidens mosaic virus
BLCV	Beet leaf curl virus
BLMoV	*Blueberry leaf mottle virus*
BlMVd-RNA	Blueberry mosaic viroid-like RNA
BlScV	*Blueberry scorch virus*
BlShV	*Blueberry shock virus*
BLRV	*Bean leafroll virus*
BMV	*Brome mosaic virus*
BMMV	*Bean mild mosaic virus*
BmoV	Blackgram mottle virus
BMYV	*Beet mild yellowing virus*
BNYV	*Broccoli necrotic yellows virus*
BNYVV	*Beet necrotic yellow vein virus*
BolVX	Boletus virus X
BPMV	*Bean pod mottle virus*
BPYV	*Beet pseudoyellows virus*
BRAV	*Blackcurrant reversion associated virus*
BraYSV	Brachypodium yellow streak virus
BRMV	*Bean rugose mosaic virus*
BrmYMV	Bramble yellow mosaic virus
BRNV	Black raspberry necrosis virus
BRRV	*Blueberry red ringspot virus*
BrSMV	*Bromus striate mosaic virus*
BRSV	*Beet ringspot virus*
BryMoV	Bryonia mottle virus
BSBMV	*Beet soil-borne mosaic virus*
BSBV	*Beet soil-borne virus*
BSMV	*Barley stripe mosaic virus*
BSSV	*Blueberry shoestring virus*
BStV	*Brome streak virus*
BSV	*Banana streak virus*
BtMV	*Beet mosaic virus*
BuSVd	*Burdock stunt viroid*
ButMV	Butterbur mosaic virus
BuYV	*Burdock yellows virus*
BVQ	*Beet virus Q*
BWSpV	Brazilian wheat spike virus
BWYV	*Beet western yellows virus*
BYDV-GPV	*Barley yellow dwarf virus – GPV*
BYDV-MAV	*Barley yellow dwarf virus – MAV*
BYDV-PAV	*Barley yellow dwarf virus – PAV*
BYDV-RMV	*Barley yellow dwarf virus – RMV*
BYDV-SGV	*Barley yellow dwarf virus – SGV*
BYMV	*Bean yellow mosaic virus*
BYSMV	*Barley yellow striate mosaic virus*
BYSV	*Beet yellow stunt virus*
BYV	*Beet yellows virus*
BYVBV	*Bean yellow vein-banding virus*
BYVMV	*Bhendi yellow vein mosaic virus*
CABMV	*Cowpea aphid-borne mosaic virus*
CABYV	*Cucurbit aphid-borne yellows virus*
CalMMV	*Calanthe mild mosaic virus*
CaLV	Cardamine latent virus
CalYVV	*Calopogonium yellow vein virus*
CaMV	*Cauliflower mosaic virus*
CapLV	*Caper latent virus*
CarMV	*Carnation mottle virus*
CasMMV	Cassia mild mosaic virus

名称缩写	病毒名称	名称缩写	病毒名称
CasYSV	Cassia yellow spot virus	ChYNMV	Chinese yam necrotic mosaic virus
CawLV	Caraway latent virus	ClEV	Clover enation virus
CaYMV	*Canna yellow mottle virus*	CiLV	Citrus leprosis virus
CBDV	Colocasia bobone disease virus	ClRV	*Carnation Italian ringspot virus*
CBLVd	*Citrus bent leaf viroid*	CLCrV	*Cotton leaf crumple virus*
CBV	Carnation bacilliform virus	CLCuV-Pk1	*Cotton leaf curl virus – Pakistan 1*
CbVd-1	*Coleus blumei viroid 1*	CLCuV-Pk2	*Cotton leaf curl virus – Pakistan 2*
CbVd-2	*Coleus blumei viroid 2*	CiLRV	*Citrus leaf rugose virus*
CbVd-3	*Coleus blumei viroid 3*	CLRV	*Cherry leafroll virus*
CCCV	Callistephus chinensis chlorosis virus	CLSV	*Cucumber leafspot virus*
CCCVd	*Coconut cadang-cadang viroid*	CLV	*Carnation latent virus*
CCFV	*Cardamine chlorotic fleck virus*	CLVd	*Columnea latent viroid*
CChMVd	*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*	ClYMV	*Clover yellow mosaic virus*
CCLV	*Crimson clover latent virus*	ClYVV	*Clover yellow vein virus*
CCMoV	Cereal chlorotic mottle virus	CMBV	*Citrus mosaic virus*
CCMV	*Cowpea chlorotic mottle virus*	CMMV	Cocksfoot mild mosaic virus
CCSV	Cucumber chlorotic spot virus	CMoMV	*Carrot mottle mimic virus*
CCV-1	*Carnation cryptic virus 1*	CMoV	*Carrot mottle virus*
CCV-2	Carnation cryptic virus 2	CMV	*Cucumber mosaic virus*
CdMV	*Cardamom mosaic virus*	CNFV	*Carnation necrotic fleck virus*
CdTV	*Chino del tomate virus*	CnMMV	Canavalia maritima mosaic virus
CDV	*Colombian datura virus*	CnMoV	Cynosurus mottle virus
CeMV	*Celery mosaic virus*	CNSV	*Cycas necrotic stunt virus*
CenMV	Centrosema mosaic virus	CoLV	*Cole latent virus*
CerMV	*Ceratobium mosaic virus*	ComMV	*Commelina mosaic virus*
CERV	*Carnation etched ring virus*	CoMV	*Cocksfoot mottle virus*
CEVd	*Citrus exocortis viroid*	ComVX	*Commelina virus X*
CeYMV	Celery yellow mosaic virus	ComYMV	*Commelina yellow mottle virus*
CFDV	*Coconut foliar decay virus*	CoNV	*Cocoa necrosis virus*
CFRVV	Coriander feathery red vein virus	CoRSV	Coffee ringspot virus
CFV	Chrysanthemum frutescens virus	CPaMV	Cow parsnip mosaic virus
CGMMV	*Cucumber green mottle mosaic virus*	CpBDV	Chickpea bushy dwarf virus
CGRMV	*Cherry green ring mottle virus*	CpCDV	Chickpea chlorotic dwarf virus
CGVBV	*Cowpea green vein banding virus*	CpFV	Chickpea filiform virus
ChaCV	Chara corallina virus	CPGMV	*Cowpea golden mosaic virus*
ChiVMV	*Chilli veinal mottle virus*	CPMMV	*Cowpea mild mottle virus*
ChMV	*Chayote mosaic virus*	CPMoV	*Cowpea mottle virus*
ChNV	*Chenopodium necrosis virus*	CPMV	*Cowpea mosaic virus*
ChYBV	Chicory yellow blotch virus	CPRMV	Cowpea rugose mosaic virus
ChYMV	*Chicory yellow mottle virus*	CpSDaV	*Chickpea stunt disease-associated virus*

名称缩写	病毒名称
CPSMV	*Cowpea severe mosaic virus*
CPsV	*Citrus psorosis virus*
CraV	Cynara virus
CriMV	Crinum mosaic virus
CRLV	*Cherry rasp leaf virus*
CRMV	Canary reed mosaic virus
CroCV	Croatian clover virus
CRSV	*Carnation ringspot virus*
CRV	Cherry rosette virus
CsALV	*Cassava American latent virus*
CsCMV	*Cassava common mosaic virus*
CsGMV	*Cassava green mottle virus*
CsIBV	*Cassava Ivorian bacilliform virus*
CSMV	*Chloris striate mosaic virus*
CSNV	*Chrysanthemum stem necrosis virus*
CsSLV	Cassava symptomless virus
CSSV	*Cacao swollen shoot virus*
CSV	*Cocksfoot streak virus*
CsVC	*Cassava virus C*
CsVMV	*Cassava vein mosaic virus*
CSVd	*Chrysanthemum stunt viroid*
CsVX	*Cassava virus X*
CTeV-1	*Carrot temperate virus 1*
CTeV-2	*Carrot temperate virus 2*
CTeV-3	*Carrot temperate virus 3*
CTeV-4	*Carrot temperate virus 4*
CTiVd	*Coconut tinangaja viroid*
CTLV	*Carrot thin leaf virus*
CtLV	Carrot latent virus
CtMV	Carrot mosaic virus
CtRLV	*Carrot red leaf virus*
CTV	*Citrus tristeza virus*
CtYMV	Clitoria yellow mosaic virus
CuCV	Cucumber cryptic virus
CuNV	*Cucumber necrosis virus*
CuSBV	*Cucumber soil-borne virus*
CV	Cestrum virus
CV-2	*Cactus virus 2*
CVA	*Cherry virus A*
CVB	*Chrysanthemum virus B*
CVCV	Chrysanthemum vein chlorosis virus
CVd-III	*Citrus III viroid*
CVd-IV	*Citrus IV viroid*
CVMoV	*Carnation vein mottle virus*
CVV	*Citrus variegation virus*
CVX	*Cactus virus X*
CYBV	*Cassia yellow blotch virus*
CYDV-RMV	Cereal yellow dwarf virus – RMV
CYDV-RPV	*Cereal yellow dwarf virus – RPV*
CYLV	*Carrot yellow leaf virus*
CymMV	*Cymbidium mosaic virus*
CYMoV	Camellia yellow mottle virus
CymRSV	*Cymbidium ringspot virus*
CYMV	*Cacao yellow mosaic virus*
CynMV	Cynodon mosaic virus
CypCSV	Cypripedium chlorotic streak virus
CYSDV	*Cucurbit yellow stunting disorder virus*
CYSV	Carnation yellow stripe virus
CYV	Clover yellows virus
CYVMV	*Croton yellow vein mosaic virus*
CYVV	*Clitoria yellow vein virus*
DaLV	*Dandelion latent virus*
DaYMV	*Dandelion yellow mosaic virus*
DBV	*Dioscorea bacilliform virus*
DDMV	Datura distortion mosaic virus
DesMV	Desmodium mosaic virus
DipMV	Dipladenia mosaic virus
DiSMV	*Digitaria striate mosaic virus*
DiSV	Digitaria striate virus
DLSV	Dendrobium leaf streak virus
DLV	Dioscorea latent virus
DMMV	Dock mottling mosaic virus
DMV	*Dahlia mosaic virus*
DNV	Datura necrosis virus
DoYMV	*Dolichos yellow mosaic virus*
DsMV	*Dasheen mosaic virus*
DSSV	*Datura shoestring virus*
DSV	*Digitaria streak virus*
DTMV	Datura mosaic virus
DTV	Dioscorea trifida virus
DuMV	*Dulcamara mottle virus*
DuVA	Dulcamara virus A
DuVB	Dulcamara virus B
DV-437	Datura virus 437
DVCV	Diodea vein chlorosis virus
DYMoV	*Desmodium yellow mottle virus*
DVNV	Dendrobium vein necrosis virus
DVS	Daphne virus S
DVX	*Daphne virus X*
DVY	Daphne virus Y

续表

名称缩写	病毒名称
DYVV	*Datura yellow vein virus*
EACMV	*East African cassava mosaic virus*
EFV	Euonymus fasciation virus
EGMV	Eggplant green mosaic virus
EHBV	*Echinochloa hoja blanca virus*
ElLV	Elderberry latent virus
ElSLV	*Elderberry symptomless virus*
ELVd	*Eggplant latent viroid*
EMCV	*Eggplant mottled crinkle virus*
EMDV	*Eggplant mottled dwarf virus*
EMMV	Eggplant mild mottle virus
EMoV	*Elm mottle virus*
EMV	*Eggplant mosaic virus*
ENMV	*Endive necrotic mosaic virus*
EpCV	*Epirus cherry virus*
EpYVV	*Eupatorium yellow vein virus*
ErLV	*Erysimum latent virus*
ERSV	*Echinochloa ragged stunt virus*
ESMoV	Eggplant severe mottle virus
EuMV	*Euphorbia mosaic virus*
EuoMV	Euonymus mosaic virus
EuRSV	Euphorbia ringspot virus
EWSMV	European wheat striate mosaic virus
EYMV	Eggplant yellow mosaic virus
EYVV	*Eclipta yellow vein virus*
FBNYV	*Faba bean necrotic yellows virus*
FClLV	*Fragaria chiloensis latent virus*
FCV	Fescue cryptic virus
FDV	*Fiji disease virus*
FigLCV	Fig leaf chlorosis virus
FlCV	Flame chlorosis virus
FLNV	Freesia leaf necrosis virus
FLSV	*Festuca leaf streak virus*
FLV	Fuchsia latent virus
FMMV	Finger millet mosaic virus
FMV	*Figwort mosaic virus*
FNSV	Furcraea necrotic streak virus
FNV	Festuca necrosis virus
FoMV	*Foxtail mosaic virus*
FreMV	*Freesia mosaic virus*
FrMV	*Frangipani mosaic virus*
FVS	Fig virus S
GALV	*Grapevine Algerian latent virus*
GaMV	*Galinsoga mosaic virus*
GarCLV	*Garlic common latent virus*
GarLV	*Garlic latent virus*
GarMbFV	*Garlic mite-borne filamentous virus*
GarMbLV	Garlic mite-borne latent virus
GarMV	Garlic mosaic virus
GarV-A	*Garlic virus A*
GarV-B	*Garlic virus B*
GarV-C	*Garlic virus C*
GarV-D	*Garlic virus D*
GarV-X	*Garlic virus X*
GBLV	*Grapevine Bulgarian latent virus*
GBNV	*Groundnut bud necrosis virus*
GCFSV	*Groundnut chlorotic fan-spot virus*
GCFV	Ginger chlorotic fleck virus
GCMV	*Grapevine chrome mosaic virus*
GCTV	Garland chrysanthemum temperate virus
GenLV	Gentiana latent virus
GeSLV	Gerbera symptomless virus
GEV	*Groundnut eyespot virus*
GFkV	Grapevine fleck virus
GFLV	*Grapevine fanleaf virus*
GGMV	*Guinea grass mosaic virus*
GINV	*Grapevine berry inner necrosis virus*
GLRaV-1	*Grapevine leafroll-associated virus 1*
GLRaV-2	*Grapevine leafroll-associated virus 2*
GLRaV-3	*Grapevine leafroll-associated virus 3*
GLRaV-4	Grapevine leafroll-associated virus 4
GLRaV-5	*Grapevine leafroll-associated virus 5*
GLRaV-6	Grapevine leafroll-associated virus 6
GLRaV-7	Grapevine leafroll-associated virus 7
GMoV	Glycine mottle virus
GMV	*Glycine mosaic virus*
GoV	Gomphrena virus
GRAV	*Groundnut rosette assistor virus*
GRSV	*Groundnut ringspot virus*

续表

名称缩写	病毒名称
GRV	*Groundnut rosette virus*
GSLV	Guar symptomless virus
GSMV	*Gloriosa stripe mosaic virus*
GTRSV	*Grapevine Tunisian ringspot virus*
GVA	*Grapevine virus A*
GVB	*Grapevine virus B*
GVC	Grapevine virus C
GVD	*Grapevine virus D*
GyLV	Gynura latent virus
GYSV	*Groundnut yellow spot virus*
GYSVd-1	*Grapevine yellow speckle viroid 1*
GYSVd-2	*Grapevine yellow speckle viroid 2*
HaMV	Habenaria mosaic virus
HCRSV	*Hibiscus chlorotic ringspot virus*
HDIV	Hungarian datura innoxia virus
HdLV	*Hydrangea latent virus*
HdMV	*Hydrangea mosaic virus*
HdRSV	*Hydrangea ringspot virus*
HeMV	Helleborus mosaic virus
HgYMV	*Horsegram yellow mosaic virus*
HiMV	*Hippeastrum mosaic virus*
HJLV	*Humulus japonicus latent virus*
HLCV	*Hollyhock leaf curl virus*
HLRSV	*Hibiscus latent ringspot virus*
HLV	*Heracleum latent virus*
HLYV	Holcus lanatus yellowing virus
HMV	*Henbane mosaic virus*
HnLV	*Honeysuckle latent virus*
HoMV	*Hordeum mosaic virus*
HpLV	*Hop latent virus*
HpLVd	*Hop latent viroid*
HpMV	*Hop mosaic virus*
HrCTV	*Horseradish curly top virus*
HrLV	*Horseradish latent virus*
HSV	Holcus streak virus
HSVd	*Hop stunt viroid*
HTCV-1	*Hop trefoil cryptic virus 1*
HTCV-2	*Hop trefoil cryptic virus 2*
HTCV-3	*Hop trefoil cryptic virus 3*
HTFMoV	Hart's tongue fern mottle virus
HV-6	Heracleum virus 6
HVS	*Helenium virus S*
HVX	*Hosta virus X*
HVY	*Helenium virus Y*
HyaMV	*Hyacinth mosaic virus*
HyMV	Hypochoeris mosaic virus
HYVMV	*Honeysuckle yellow vein mosaic virus*
ICMV	*Indian cassava mosaic virus*
IFMV	*Iris fulva mosaic virus*
IGLSV	Iris germanica leaf stripe virus
ILV	Impatiens latent virus
IMMV	*Iris mild mosaic virus*
INSV	*Impatiens necrotic spot virus*
IPCV	*Indian peanut clump virus*
IPMoV	Indian pepper mottle virus
IrVd-1	*Iresine viroid 1*
IsaMV	Isachne mosaic virus
ISDV	*Indonesian soybean dwarf virus*
ISMV	*Iris severe mosaic virus*
IToLCV	*Indian tomato leaf curl virus*
IVCV	Ivy vein clearing virus
IWSV	Iranian wheat stripe virus
IYSV	*Iris yellow spot virus*
JGMV	*Johnsongrass mosaic virus*
JMV	*Jatropha mosaic virus*
KGMMV	*Kyuri green mottle mosaic virus*
KLV	*Kalanchoë latent virus*
KMV	*Kalanchoë mosaic virus*
KoMV	*Konjac mosaic virus*
KTSV	*Kalanchoë top-spotting virus*
KVY	Kennedya virus Y
KYMV	*Kennedya yellow mosaic virus*
LALV	*Lucerne Australian latent virus*
LArSV	Launea arborescens stunt virus
LASV	Lucerne Australian symptomless virus
LBVV	*Lettuce big-vein virus*
LChV	*Little cherry virus*
LCV	*Lettuce chlorosis virus*
LeMV	*Leonurus mosaic virus*
LEV	Lucerne enation virus
LGMV	*Limabean golden mosaic virus*
LiCLV	*Lilac chlorotic leafspot virus*
LiMoV	*Lilac mottle virus*
LiRMoV	*Lilac ring mottle virus*
LiRSV	Lilac ringspot virus
LIYV	*Lettuce infectious yellows virus*
LLCV	Lupin leaf curl virus
LMMV	*Lamium mild mosaic virus*
LMMoV	Lily mild mottle virus

续表

名称缩写	病毒名称
LMoV	*Lily mottle virus*
LMV	*Lettuce mosaic virus*
LNV	Lisianthus necrosis virus
LNYV	*Lettuce necrotic yellows virus*
LoRV	Lolium ryegrass virus
LoSNV	Lotus stem necrosis
LRLV	Laelia red leafspot virus
LRSV	*Lychnis ringspot virus*
LRV	*Lato river virus*
LSLV	*Lily symptomless virus*
LSMV	*Lettuce speckles mottle virus*
LSTCV	Lemon scented thyme leaf chlorosis virus
LTSV	*Lucerne transient streak virus*
LVX	*Lily virus X*
LWSV	*Leek white stripe virus*
LycSLV	Lychnis symptomless virus
LYSV	*Leek yellow stripe virus*
LYVV	Lupin yellow vein virus
MacMV	*Maclura mosaic virus*
MaMoV	Marigold mottle virus
MaMV	*Macrotyloma mosaic virus*
MarMV	Maracuja mosaic virus
MaSV	Malva silvestris virus
MbMV	Mungbean mosaic virus
MBV	Mimosa bacilliform virus
MCDV	*Maize chlorotic dwarf virus*
MCMV	*Maize chlorotic mottle virus*
MCV	*Malvaceous chlorosis virus*
MDMV	*Maize dwarf mosaic virus*
MDV	*Milk vetch dwarf virus*
MegMV	Megakepasma mosaic virus
MeLV	Melilotus latent virus
MeMV	Melilotus mosaic virus
MGMV	*Macroptilium golden mosaic virus*
MiMV	*Mirabilis mosaic virus*
MiSV	*Miscanthus streak virus*
MLCV	*Melon leaf curl virus*
MLRSV	*Myrobalan latent ringspot virus*
MLV	*Mulberry latent virus*
MMoV	Mungbean mottle virus
MMV	*Maize mosaic virus*
MNSV	*Melon necrotic spot virus*
MoSV	Molinia streak virus
MPV	*Moroccan pepper virus*
MPVd	*Mexican papita viroid*
MRDV	*Maize rough dwarf virus*
MRFV	*Maize rayado fino virus*
MRMV	*Melon rugose mosaic virus*
MRSV	*Mulberry ringspot virus*
MSpV	*Maize stripe virus*
MSSV	Maize sterile stunt virus
MSV	*Maize streak virus*
MTV	Mibuna temperate virus
MVBMV	Melon vein-banding mosaic virus
MVCV	*Malva vein clearing virus*
MuVNV	*Muskmelon vein necrosis virus*
MVNV	Malva veinal necrosis virus
MVV	Melon variegation virus
MWLMV	Maize white line mosaic virus
MWMV	*Moroccan watermelon mosaic virus*
MYFV	*Melandrium yellow fleck virus*
MYMV	*Mungbean yellow mosaic virus*
NaMV	Nandina mosaic virus
NCMV	*Northern cereal mosaic virus*
NDV	*Narcissus degeneration virus*
NeCMV	Negro coffee mosaic virus
NeLV	*Nerine latent virus*
NeYSV	*Nerine yellow stripe virus*
NGSVd	*Nicotiana glutinosa stunt viroid*
NLSYV	*Narcissus late season yellows virus*
NLV	*Narcissus latent virus*
NMV	*Narcissus mosaic virus*
NoMV	*Nothoscordum mosaic virus*
NRV	*Neckar river virus*
NSPV	Nandina stem pitting virus
NTNV	Narcissus tip necrosis virus
NVMV	Nicotiana velutina mosaic virus
NVX	*Nerine virus X*
NVY	Nerine virus Y
NV	Nerine virus
NYSV	*Narcissus yellow stripe virus*
OBDV	*Oat blue dwarf virus*
ObPV	*Obuda pepper virus*
OCSV	*Oat chlorotic stunt virus*
OFV	Orchid fleck virus
OkMV	*Okra mosaic virus*

续表

名称缩写	病毒名称
OLCV	*Okra leaf curl virus*
OLRSV	*Olive latent ringspot virus*
OLV-1	*Olive latent virus 1*
OLV-2	*Olive latent virus 2*
OMbLV	Onion mite-borne latent virus
OMV	*Oat mosaic virus*
ONMV	*Oat necrotic mottle virus*
OrMV	*Ornithogalum mosaic virus*
ORSV	*Odontoglossum ringspot virus*
OSDV	*Oat sterile dwarf virus*
OSMV	Oat striate mosaic virus
OuMV	*Ourmia melon virus*
OYDV	*Onion yellow dwarf virus*
OYMV	*Ononis yellow mosaic virus*
PaLCV	*Papaya leaf curl virus*
PalMV	Palm mosaic virus
PaLV	Parsley latent virus
PaMMV	*Paprika mild mottle virus*
PAMV	*Potato aucuba mosaic virus*
PanSV	*Panicum streak virus*
PapMV	*Papaya mosaic virus*
ParMV	*Parsnip mosaic virus*
ParV-3	Parsnip virus 3
ParV-5	Parsnip virus 5
PaSV	*Pangola stunt virus*
PatMMV	*Patchouli mild mosaic virus*
PatMoV	Patchouli mottle virus
PatVX	Patchouli virus X
PaV	Parsley virus
PaV-5	Parsley virus 5
PBCVd	*Pear blister canker viroid*
PBRSV	*Potato black ringspot virus*
PBV	*Pineapple bacilliform virus*
PCLSV	Pineapple chlorotic leaf streak virus
PcMV	Pecteilis mosaic virus
PCSV	*Peanut chlorotic streak virus*
PCV	*Peanut clump virus*
PDV	*Prune dwarf virus*
PEBV	*Pea early-browning virus*
PeGMoV	Peanut green mottle virus
PeMoV	*Peanut mottle virus*
PEMV-1	*Pea enation mosaic virus 1*
PEMV-2	*Pea enation mosaic virus 2*
PepLCV	*Pepper leaf curl virus*
PepMoV	*Pepper mottle virus*
PepMTV	*Pepper mild tigré virus*
PepMV	*Pepino mosaic virus*

名称缩写	病毒名称
PepRSV	*Pepper ringspot virus*
PepSMV	*Pepper severe mosaic virus*
PerMoV	*Perilla mottle virus*
PeSV	*Pea streak virus*
PetAMV	*Petunia asteroid mosaic virus*
PetFMV	*Petunia flower mottle virus*
PeYMV	*Peanut yellow mosaic virus*
PFBV	*Pelargonium flower break virus*
PFMoV	Passion fruit mottle virus
PFRSV	Passion fruit ringspot virus
PFYMV	*Passion fruit yellow mosaic virus*
PGMV	*Pea green mottle virus*
PhCSV	Phalaenopsis chlorotic spot virus
PHV	*Pepper huasteco virus*
PhyMV	*Physalis mottle virus*
PhySMV	*Physalis severe mottle virus*
PkMV	*Pokeweed mosaic virus*
PlAMV	*Plantago asiatica mosaic virus*
PLCV	*Pelargonium leaf curl virus*
PLDMV	*Papaya leaf distortion mosaic virus*
PleMV	Pleioblastus mosaic virus
PlMoV	*Plantago mottle virus*
PlMV	Plantain mottle virus
PLMVd	*Peach latent mosaic viroid*
PLRV	*Potato leafroll virus*
PlSMoV	*Plantago severe mottle virus*
PLV	*Passiflora latent virus*
PlV-4	Plantago virus 4
PlV-6	Plantain virus 6
PlV-7	Plantain virus 7
PlV-8	Plantain virus 8
PlVX	*Plantain virus X*
PMiMV	*Pea mild mosaic virus*
PMMoV	*Pepper mild mottle virus*
PMMV	Pepper mild mosaic virus
PMoV	*Parietaria mottle virus*
PMTV	*Potato mop-top virus*
PMV	*Panicum mosaic virus*
PMWaV-1	*Pineapple mealybug wilt-associated virus 1*
PMWaV-2	*Pineapple mealybug wilt-associated virus 2*
PnCV	Poinsettia cryptic virus
PnMV	Poinsettia mosaic virus
PNRSV	*Prunus necrotic ringspot virus*
PoLV	*Pothos latent virus*

续表

名称缩写	病毒名称
PopDV	Poplar decline virus
PopMV	*Poplar mosaic virus*
PPMMoVd	*Pigeon pea mosaic mottle viroid*
PPPV	Pigeon pea proliferation virus
PPV	*Plum pox virus*
PRMV	*Peach rosette mosaic virus*
PrMoV	Primula mottle virus
PrMV	Primula mosaic virus
PRSV	*Papaya ringspot virus*
PruVS	Prunus virus S
PSbMV	*Pea seed-borne mosaic virus*
PSLV	*Poa semilatent virus*
PSMV	*Paspalum striate mosaic virus*
PSTVd	*Potato spindle tuber viroid*
PSV	*Peanut stunt virus*
PTV	*Peru tomato mosaic virus*
PVA	*Potato virus A*
PVBV	Pepper vein banding virus
PVCV	*Petunia vein clearing virus*
PVM	*Potato virus M*
PVMV	*Pepper veinal mottle virus*
PVS	*Potato virus S*
PVT	*Potato virus T*
PVU	*Potato virus U*
PVV	*Potato virus V*
PVX	*Potato virus X*
PVY	*Potato virus Y*
PWV	*Passion fruit woodiness virus*
PYDV	*Potato yellow dwarf virus*
PYFV	*Parsnip yellow fleck virus*
PYMoV	*Piper yellow mottle virus*
PYMV	*Potato yellow mosaic virus*
PYVV	*Pseuderanthemum yellow vein virus*
PZSV	Pelargonium zonate spot virus
QPMV	*Quail pea mosaic virus*
RaMV	*Radish mosaic virus*
RanMoV	Ranunculus mottle virus
RaRSV	Ranunculus repens symptomless virus
RaV	Raphanus virus
RaVCV	Radish vein clearing virus
RBDV	*Raspberry bushy dwarf virus*
RBSDV	*Rice black streaked dwarf virus*
RCCV-2	*Red clover cryptic virus 2*
RClMV	Red clover mosaic virus
RCMV	*Red clover mottle virus*
RCNMV	*Red clover necrotic mosaic virus*
RCSV	Rubus Chinese seed-borne virus
RCVMV	*Red clover vein mosaic virus*
RDV	*Rice dwarf virus*
ReTBV	*Rembrandt tulip breaking virus*
RGCV	*Ryegrass cryptic virus*
RGDV	*Rice gall dwarf virus*
RGMV	*Ryegrass mosaic virus*
RGSV	*Rice grassy stunt virus*
RHBV	*Rice hoja blanca virus*
RhMV	*Rhynchosia mosaic virus*
RMV	*Ribgrass mosaic virus*
RNMV	*Rice necrosis mosaic virus*
RoNRSV	Rhododendron necrotic ringspot virus
RPCV-1	Red pepper cryptic virus 1
RPCV-2	Red pepper cryptic virus 2
RpRSV	*Raspberry ringspot virus*
RRSV	*Rice ragged stunt virus*
RSNV	Rice stripe necrosis virus
RSV	*Rice stripe virus*
RTBV	*Rice tungro bacilliform virus*
RSPaV	*Rupestris stem pitting-associated virus*
RTSV	*Rice tungro spherical virus*
RTV	Rhubarb temperate virus
RuMV	Rudbeckia mosaic virus
RV-1	Rhubarb virus 1
RVCV	Raspberry vein chlorosis virus
RWMV	*Ranunculus white mottle virus*
RWSV	Rice wilted stunt virus
RYEV	*Radish yellow edge virus*
RYMV	*Rice yellow mottle virus*
RYSV	*Rice yellow stunt virus*
SACMV	*South African cassava mosaic virus*
SALCV	Solanum apical leaf curl virus
SbCMV	*Soybean chlorotic mottle virus*
SBDMV	Sword bean distortion mosaic virus
SbDV	*Soybean dwarf virus*
SBLV	*Spring beauty latent virus*
SBMV	*Southern bean mosaic virus*
SBRMV	Soil-borne rye mosaic virus

续表

名称缩写	病毒名称
SBWMV	*Soil-borne wheat mosaic virus*
SCBV	*Sugarcane bacilliform virus*
SCLV	*Soybean crinkle leaf virus*
SCMoV	*Subterranean clover mottle virus*
SCMV	*Sugarcane mosaic virus*
SCNMV	*Sweet clover necrotic mosaic virus*
SCPMV	*Southern cowpea mosaic virus*
ScrMV	*Scrophularia mottle virus*
SCSV	*Subterranean clover stunt virus*
SCV	*Strawberry crinkle virus*
SDV	*Satsuma dwarf virus*
SgCV	*Saguaro cactus virus*
SGMV	*Serrano golden mosaic virus*
ShMbLV	Shallot mite-borne latent virus
SHMV	*Sunn-hemp mosaic virus*
ShVX	*Shallot virus X*
SiGMV	*Sida golden mosaic virus*
SiYVV	*Sida yellow vein virus*
SJOLV	*Sint-Jem's onion latent virus*
SLCV	*Squash leaf curl virus*
SLCV-Ch	*Squash leaf curl virus – China*
SLNV	Sainpaulia leaf necrosis virus
SLPMoV	Sri Lankan passion fruit mottle virus
SLRSV	*Strawberry latent ringspot virus*
SmiLV	Smithiantha latent virus
SMMV	Sugarcane mild mosaic virus
SMoV	Sonchus mottle virus
SMV	*Soybean mosaic virus*
SMYEV	*Strawberry mild yellow edge virus*
SNMoV	*Solanum nodiflorum mottle virus*
SoMV	*Sowbane mosaic virus*
SonV	*Sonchus virus*
SoPLV	Southern potato latent virus
SOV	*Sammons's Opuntia virus*
SPCSV	*Sweet potato chlorotic stunt virus*
SPFMV	*Sweet potato feathery mottle virus*
SPLSV	*Sweet potato leaf speckling virus*
SPLV	*Sweet potato latent virus*
SpLV	*Spinach latent virus*
SPMMV	*Sweet potato mild mottle virus*
SPMSV	*Sweet potato mild speckling virus*
SpMV	*Spartina mottle virus*
SPMYEV	*Strawberry pseudo mild yellow edge virus*
SpTV	*Spinach temperate virus*
SPVMV	Sweet potato vein mosaic virus
SPV	Sarracenia purpurea virus
SPYDV	*Sweet potato yellow dwarf virus*
SqMV	*Squash mosaic virus*
SrCSV	*Sorghum chlorotic spot virus*
SrMV	*Sorghum mosaic virus*
SRV	*Schefflera ringspot virus*
SrV	Sorghum virus
SSV	*Sugarcane streak virus*
STLCV	*Sinaloa tomato leaf curl virus*
SToLCV	*Solanum tomato leaf curl virus*
STV	Santosai temperate virus
SuCV	Sunflower crinkle virus
SuMV	*Sunflower mosaic virus*
SuYBV	Sunflower yellow blotch virus
SVBV	*Strawberry vein banding virus*
SVCV	Sambucus vein clearing virus
SWBV	*Sikte waterborne virus*
SYBV	Soursop yellow blotch virus
SYLCV	*Solanum yellow leaf curl virus*
SYNV	*Sonchus yellow net virus*
SYSV	*Shallot yellow stripe virus*
SYVV	*Sowthistle yellow vein virus*
TaBV	*Taro bacilliform virus*
TACSV	Triticum aestivum chlorotic spot virus
TamMV	*Tamarillo mosaic virus*
TAMV	*Tulare apple mosaic virus*
TASVd	*Tomato apical stunt viroid*
TAV	*Tomato aspermy virus*
TBBV	Tulip band breaking virus
TBRV	*Tomato black ring virus*
TBSV	*Tomato bushy stunt virus*
TBTV	*Tobacco bushy top virus*
TBV	*Tulip breaking virus*
TCSV	*Tomato chlorotic spot virus*
TCV	*Turnip crinkle virus*
TeaMV	Teasel mosaic virus
TeMV	*Telfairia mosaic virus*
TeSV	Tephrosia symptomless virus
TEV	*Tobacco etch virus*
TFMoV	Taro feathery mottle virus
TGMV	*Tomato golden mosaic virus*

名称缩写	病毒名称	名称缩写	病毒名称
ThMoV	*Thistle mottle virus*	TSWV	*Tomato spotted wilt virus*
TICV	*Tomato infectious chlorosis virus*	TToMoV	*Taino tomato mottle virus*
TLCV	*Tobacco leaf curl virus*	TuMMV	*Tuberose mild mosaic virus*
TLRV	Tomato leafroll virus	TuMV	*Turnip mosaic virus*
TMGMV	*Tobacco mild green mosaic virus*	TV-1	Tropaeolum virus 1
TMMMV	*Tulip mild mottle mosaic virus*	TV-2	Tropaeolum virus 2
TMoV	*Tobacco mottle virus*	TVBMV	*Tobacco vein banding mosaic virus*
TMV	*Tobacco mosaic virus*	TVCV	*Turnip vein-clearing virus*
TMV-Cg	Crucifer strain of TMV	TVMV	*Tobacco vein mottling virus*
crTMV	Crucifer-infecting TMV	TVV	Tongan vanilla virus
TNV-A	*Tobacco necrosis virus A*	TVX	*Tulip virus X*
TNV-D	*Tobacco necrosis virus D*	TWV	Tobacco wilt virus
TNDV	*Tobacco necrotic dwarf virus*	TYDV	*Tobacco yellow dwarf virus*
ToBTVd	*Tomato bunchy top viroid*	TYLCV-Ch	*Tomato yellow leaf curl virus – China*
ToCV	*Tomato chlorosis virus*	TYLCV-Is	*Tomato yellow leaf curl virus – Israel*
ToLCV-Au	*Tomato leaf curl virus – Australia*	TYLCV-Ng	*Tomato yellow leaf curl virus – Nigeria*
ToLCV-BanI	*Tomato leaf curl virus – Bangalore I*	TYLCV-Sar	*Tomato yellow leaf curl virus – Sardinia*
ToLCV-BanII	*Tomato leaf curl virus – Bangalore II*	TYLCV-SSA	*Tomato yellow leaf curl virus – Southern Saudi Arabia*
ToLCV-NDe	*Tomato leaf curl virus – New Delhi*	TYLCV-Th	*Tomato yellow leaf curl virus – Thailand*
ToLCV-Sn	*Tomato leaf curl virus – Senegal*	TYLCV-Tz	*Tomato yellow leaf curl virus – Tanzania*
ToLCV-Tw	*Tomato leaf curl virus – Taiwan*	TYLCV-Ye	*Tomato yellow leaf curl virus – Yemen*
ToLCV-Tz	*Tomato leaf curl virus – Tanzania*	TYMV	*Turnip yellow mosaic virus*
ToMoV	*Tomato mottle virus*	TYVV	Tobacco yellow vein virus
ToMV	*Tomato mosaic virus*	UHBV	*Urochloa hoja blanca virus*
ToRSV	*Tomato ringspot virus*	UMMV	*Ullucus mild mottle virus*
ToSLCV	*Tomato severe leaf curl virus*	UMV	Ullucus mosaic virus
ToTNV	*Tomato top necrosis virus*	UVC	*Ullucus virus C*
ToYDV	*Tomato yellow dwarf virus*	ValMV	Vallota mosaic virus
ToYMoV	*Tomato yellow mottle virus*	VanMV	Vanilla mosaic virus
ToYMV	*Tomato yellow mosaic virus*	VCV	*Vicia cryptic virus*
ToYVSV	*Tomato yellow vein streak virus*	VMoV	Viola mottle virus
TPCTV	*Tomato pseudo-curly top virus*	VNMV	*Voandzeia necrotic mosaic virus*
TPMVd	*Tomato planta macho viroid*	VSMV	Vigna sinensis mosaic virus
TraMV	Tradescantia mosaic virus	VTMoV	*Velvet tobacco mottle virus*
TrMoV	Trichosanthes mottle virus	WASMV	*Wheat American striate mosaic virus*
TRMV	*Tamus red mosaic virus*	WBMV	White bryony mosaic virus
TrMV	*Tropaeolum mosaic virus*		
TRoV	*Turnip rosette virus*		
TRSV	*Tobacco ringspot virus*		
TRV	*Tobacco rattle virus*		
TStV	Tobacco stunt virus		
TSV	*Tobacco streak virus*		

续表

名称缩写	病毒名称
WBNV	*Watermelon bud necrosis virus*
WBV	*White bryony virus*
WCCV-1	*White clover cryptic virus 1*
WCCV-2	*White clover cryptic virus 2*
WCCV-3	*White clover cryptic virus 3*
WClMV	*White clover mosaic virus*
WClVL	White clover virus L
WCMV	*Wild cucumber mosaic virus*
WCSV	Wheat chlorotic streak virus
WDV	*Wheat dwarf virus*
WGMV	*Wissadula golden mosaic virus*
WmCMV	*Watermelon curly mottle virus*
WmCSV	*Watermelon chlorotic stunt virus*
WMV	*Watermelon mosaic virus*
WPMV	*Wild potato mosaic virus*
WRSV	Wheat rosette stunt virus
WSMoV	*Watermelon silver mottle virus*
WSMV	*Wheat streak mosaic virus*
WSSMV	*Wheat spindle streak mosaic virus*
WTV	*Wound tumor virus*
WVMV	*Wisteria vein mosaic virus*
WWBV	*Weddel waterborne virus*
WWMV	Winter wheat mosaic virus
WWRMV	Winter wheat Russian mosaic virus
WYLV	*Wheat yellow leaf virus*
WYMV	*Wheat yellow mosaic virus*
WYSV	Watercress yellow spot virus
YBV	Yucca bacilliform virus
YMV	*Yam mosaic virus*
YoMV	*Youcai mosaic virus*
ZeMV	*Zea mosaic virus*
ZiLCV	*Zinnia leaf curl virus*
ZLCV	*Zucchini lethal chlorosis virus*
ZMV	Zea mays virus
ZoMV	Zoysia mosaic virus
ZSLV	Zygocactus symptomless virus
ZYFV	*Zucchini yellow fleck virus*
ZYMV	*Zucchini yellow mosaic virus*

附录 2A

植物病毒的分类

基因组*	科	属	代表种	种数	暂定种数
dsDNA (RT)	*Caulimoviridae* 花椰菜花叶病毒科	*Badnavirus* 杆状 DNA 病毒属	*Commelina yellow mottle virus* 鸭跖草黄斑驳病毒	18	5
		Caulimovirus 花椰菜花叶病毒属	*Cauliflower mosaic virus* 花椰菜花叶病毒	8	4
		Soymovirus 大豆斑驳病毒属	*Soybean chlorotic mottle virus* 大豆褪绿斑驳病毒	3	0
		Cavemovirus 木薯脉花叶病毒属	*Cassava vein mosaic virus* 木薯脉花叶病毒	2	0
		Petuvirus 碧冬茄明脉病毒属	*Petunia vein clearing virus* 碧冬茄明脉病毒	1	0
		Tungrovirus 东格鲁病毒属	*Rice tungro bacilliform virus* 水稻东格鲁杆状病毒	1	0
ssDNA	*Geminiviridae* 双生病毒科	*Mastrevirus* 玉米线条病毒属	*Maize streak virus* 玉米线条病毒	12	2
		Curtovirus 曲顶病毒属	*Beet curly top virus* 甜菜曲顶病毒	3	1
		Begomovirus 菜豆金色花叶病毒属	*Bean golden yellow mosaic virus* 菜豆金色黄花叶病毒	76	8
		Topocuvirus 番茄伪曲顶病毒属	*Tomato pseudo-curly top virus* 番茄伪曲顶病毒	1	0
ssDNA	*Nanoviridae* 矮缩病毒科**	*Nanovirus* 矮缩病毒属	*Subterranean clover stunt virus* 地三叶草矮化病毒	3	0
		Babuvirus 香蕉束顶病毒属**	*Banana bushy top virus* 香蕉束顶病毒	1	0
dsRNA	*Reoviridae* 呼肠病毒科	*Fijivirus* 斐济病毒属	*Fiji disease virus* 甘蔗斐济病毒	8	0
		Oryzavirus 水稻病毒属	*Rice ragged stunt virus* 水稻齿叶矮缩病毒	2	0
		Phytoreovirus 植物呼肠病毒属	*Wound tumor virus* 伤瘤病毒	3	1
dsRNA	*Partitiviridae* 双分病毒科	*Alphacryptovirus* α 隐潜病毒属	*White clover cryptic virus 1* 白三叶草隐潜病毒 1 号	16	10
		Betacryptovirus β 隐潜病毒属	*White clover cryptic virus 2* 白三叶草隐潜病毒 2 号	4	1
ssRNA (RT)	*Pseudoviridae* 伪病毒科	*Pseudovirus* 伪病毒属	*Saccharomyces cerrevisiae Ty1 virus* 酿酒酵母 Ty1 病毒	16	0
		Sirevirus	*Glycine max SIRE1 virus*	5**	0

续表

基因组*	科	属	代表种	种数	暂定种数
		塞尔病毒属**	大豆 SIRE1 病毒		
	Metaviridae 转座病毒科	*Metavirus* 转座病毒属	*Saccharomyces cerrevisiae Ty3 virus* 酿酒酵母 Ty3 病毒	3	0
ssRNA (-)	*Rhabdoviridae* 弹状病毒科	*Cytorhabdovirus* 细胞质弹状病毒属	*Lettuce necrotic yellows virus* 莴苣坏死黄化病毒	8	0
		Nucleorhabdovirus 细胞核弹状病毒属	*Potato yellow dwarf virus* 马铃薯黄矮病毒	7	0
		Unassigned 未归属的弹状病毒		58	0
ssRNA (-)	*Bunyaviridae* 布尼亚病毒科	*Tospovirus* 番茄斑萎病毒属	*Tomato spotted-wilt virus* 番茄斑萎病毒	8	5
ssRNA (-)	*Ophioviridae* 蛇状病毒科**	*Ophiovirus* 蛇状病毒属	*Citrus psorosis virus* 柑橘鳞皮病毒	5**	1**
ssRNA (-)	未归科的悬浮属	*Tenuivirus* 纤细病毒属	*Rice stripe virus* 水稻条纹病毒	6	5
ssRNA (-)		*Varicosavirus* 巨脉病毒属	*Lettuce big-vein associated virus* 莴苣巨脉相关病毒	1	1**
ssRNA (+)	*Bromoviridae* 雀麦花叶病毒科	*Bromovirus* 雀麦花叶病毒属	*Brome mosaic virus* 雀麦花叶病毒	6	0
		Cucumovirus 黄瓜花叶病毒属	*Cucumber mosaic virus* 黄瓜花叶病毒	3	0
		Alfamovirus 苜蓿花叶病毒属	*Alfalfa mosaic virus* 苜蓿花叶病毒	1	0
		Ilarvirus 等轴不稳环斑病毒属	*Tobacco streak virus* 烟草线条病毒	17	0
		Oleavirus 油橄榄病毒属	*Olive latent virus 2* 油橄榄潜病毒 2 号	1	0
ssRNA (+)	*Comoviridae* 豇豆花叶病毒科	*Comovirus* 豇豆花叶病毒属	*Cowpea mosaic virus* 豇豆花叶病毒	15	0
		Fabavirus 蚕豆病毒属	*Broad bean wilt virus 1* 蚕豆萎蔫病毒 1 号	1	0
		Nepovirus 线虫传多面体病毒属	*Tobacco ringspot virus* 烟草环斑病毒	31	9
ssRNA (+)	*Potyviridae* 马铃薯 Y 病毒科	*Potyvirus* 马铃薯 Y 病毒属	*Potato virus Y* 马铃薯 Y 病毒	91	88
		Ipomovirus 甘薯病毒属	*Sweet potato mild mottle virus* 甘薯轻斑驳病毒	1	
		Macluravirus 柘橙病毒属	*Maclura mosaic virus* 桑橙属花叶病毒	2	0
		Rymovirus 黑麦草花叶病毒属	*Ryegrass mosaic virus* 黑麦草花叶病毒	4	1
		Tritimovirus 小麦花叶病毒属	*Wheat streak mosaic virus* 小麦线条花叶病毒	2	0

续表

基因组*	科	属	代表种	种数	暂定种数
		Bymovirus 大麦黄花叶病毒属	*Barley yellow mosaic virus* 大麦黄花叶病毒	6	0
ssRNA (+)	*Tombusviridae* 番茄丛矮病毒科	*Tombusvirus* 番茄丛矮病毒属	*Tomato bushy stunt virus* 番茄丛矮病毒	13	0
		Aureusvirus 绿萝病毒属	*Pothos latent virus* 绿萝潜隐病毒	1	0
		Avenavirus 燕麦病毒属	*Oat chlorotic stunt virus* 燕麦褪绿矮化病毒	1	0
		Carmovirus 香石竹斑驳病毒属	*Carnation mottle virus* 香石竹斑驳病毒	12	6
		Dianthovirus 香石竹病毒属	*Carnation ringspot virus* 香石竹环斑病毒	4	1
		Machlomovirus 玉米褪绿斑驳病毒属	*Maize chlorotic mottle virus* 玉米褪绿斑驳病毒	1	0
		Necrovirus 坏死病毒属	*Tobacco necrosis virus A* 烟草坏死病毒 A	5	2
		Panicovirus 黍病毒属	*Panicum mosaic virus* 黍花叶病毒	1	1
ssRNA (+)	*Sequiviridae* 伴生病毒科	*Sequivirus* 伴生病毒属	*Parsnip yellow fleck virus* 欧防风黄点病毒	2	0
		Waikavirus 矮化病毒属	*Rice tungro spherical virus* 水稻东格鲁球状病毒	3	0
ssRNA (+)	*Closteroviridae* 长线病毒科	*Closterovirus* 长线病毒属	*Beet yellows virus* 甜菜黄化病毒	11	16
		Crinivirus 毛形病毒属	*Lettuce infectious yellows virus* 莴苣侵染性黄化病毒	1	0
		Ampelovirus 葡萄卷叶病毒属**	*Grapevine leafroll-associated virus 3* 葡萄卷叶伴随病毒 3 号	6	5
ssRNA (+)	*Luteoviridae* 黄症病毒科	*Luteovirus* 黄症病毒属	*Barley yellow dwarf virus-PAV* 大麦黄矮病毒 PAV	5**	0
		Polerovirus 马铃薯卷叶病毒属	*Potato leafroll virus* 马铃薯卷叶病毒	9**	0
		Enamovirus 耳突花叶病毒属	*Pea enation mosaic virus* 豌豆耳突花叶病毒	1	0
		Unassigned 未归属的黄症病毒		11	0
ssRNA (+)	*Flexiviridae* 曲线病毒科**	*Potexvirus* 马铃薯 X 病毒属	*Potato virus X* 马铃薯 X 病毒	26	19
		Carlavirus 香石竹潜隐病毒属	*Carnation latent virus* 香石竹潜隐病毒	31	29
		Foveavirus 凹陷病毒属	*Apple stem pitting virus* 苹果茎痘病毒	2	1
		Allexivirus 葱 X 病毒属	*Shallot virus X* 火葱 X 病毒	7	3
		Capillovirus	*Apple stem grooving virus*	3	1

续表

基因组*	科	属	代表种	种数	暂定种数
		发样病毒属	苹果茎沟病毒		
		Trichovirus	*Apple chlorotic leaf spot virus*	3	0
		纤毛病毒属	苹果褪绿叶斑病毒		
		Vitivirus	*Grapevine virus A*	4	1
		葡萄病毒属	葡萄A病毒		
		Mandarivirus	*Indian citrus ringspot virus*	1	0
		柑橘病毒属**	印度柑橘环斑病毒		
		Citrivirus	*Citrus leaf blotch virus*	1	0
		柑橘叶斑病毒属**	柑橘叶斑病毒		
ssRNA	*Tymoviridae*	*Tymovirus*	*Turnip yellow mosaic virus*	21	2
(+)	芜菁黄花叶病毒科	芜菁黄花叶病毒属	芜菁黄花叶病毒		
		Marafivirus	*Maize rayado fino virus*	3	0
		玉米细条病毒属	玉米细条病毒		
		Maculavirus	*Grapevine fleck virus*	1	1
		斑点病毒属**	葡萄斑点病毒		
ssRNA	未归科的悬浮属	*Tobravirus*	*Tobacco rattle virus*	3	0
(+)		烟草脆裂病毒属	烟草脆裂病毒		
		Tobamovirus	*Tobacco mosaic virus*	16	1
		烟草花叶病毒属	烟草花叶病毒		
		Hordeivirus	*Barley stripe mosaic virus*	4	0
		大麦病毒属	大麦条纹花叶病毒		
		Furovirus	*Soil-borne wheat mosaic virus*	1	4
		真菌传杆状病毒属	土传小麦花叶病毒		
		Pomovirus	*Potato mop-top virus*	2	0
		马铃薯帚顶病毒属	马铃薯帚顶病毒		
		Pecluvirus	*Peanut clump virus*	2	0
		花生丛簇病毒属	花生丛簇病毒		
		Benyvirus	*Beet necrotic yellow vein virus*	2	0
		甜菜坏死黄脉病毒属	甜菜坏死黄脉病毒		
		Sadwavirus	*Satsuma dwarf virus*	3	2
		蜜柑矮缩病毒属**	温州蜜柑矮缩病毒		
		Sobemovirus	*Southern bean mosaic virus*	11	3
		南方菜豆花叶病毒属	南方菜豆花叶病毒		
		Cheravirus	*Cherry rasp leaf virus*	2	2
		樱桃锉叶病毒属**	樱桃锉叶病毒		
		Idaeovirus	*Raspberry bushy dwarf virus*	1	0
		悬钩子病毒属	悬钩子丛矮病毒		
		Ourmiavirus	*Ourmia melon virus*	3	0
		欧尔密病毒属	欧尔密甜瓜病毒		
		Umbravirus	*Carrot mottle virus*	7	4
		幽影病毒属	胡萝卜斑驳病毒		

* 基因组类型：dsDNA (RT)，双链 DNA(复制需经过反转录阶段)；ssDNA，单链 DNA；dsRNA，双链 RNA；ssRNA(－)，负链 RNA；ssRNA(＋)，正链 RNA(mRNA)。承蒙许可，数据引自 van Regenmortel 等(2000)。

** 引自 ICTV 第八次报告的新资料[见：Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J. Desselberger, U. and Ball, L. A. (2005). Virus Taxonomy--Classification and Nomenclature of Viruses: Eighth Report of ICTV. Elsevier Academic Press, Amsterdam]或最近刚发表的关于病毒分类的新文章——译者。

附录 2B

植物病毒的特性

科	属	寄主范围[a]	传播介体[b]	粒体形态[c]	核蛋白粒体数[d]
花椰菜花叶病毒科(*Caulimoviridae*)	杆状 DNA 病毒属(*Badnavirus*)	窄	m	b	1
	花椰菜花叶病毒属(*Caulimovirus*)	窄	as	i	1
	大豆褪绿斑驳病毒属(*Soymovirus*)	窄	u	i	1
	木薯脉花叶病毒属(*Cavemovirus*)	窄	u	i	1
	碧冬茄明脉病毒属(*Petuvirus*)	窄	u	i	1
	东格鲁病毒属(*Tungrovirus*)	窄	lh	b	1
联体病毒科(*Geminiviridae*)	玉米线条病毒属(*Mastrevirus*)	窄	lc	g	1
	曲顶病毒属(*Curtovirus*)	宽-窄	lc	g	1
	菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)	窄	w	g	1 或 2
	番茄伪曲顶病毒属(*Topocuvirus*)**	窄	th	g	1
矮缩病毒科(*Nanoviridae*)**	矮缩病毒属(*Nanovirus*)	窄	ac	i	8**
	香蕉束顶病毒属(*Babuvirus*)	窄	ac	i	6**
呼肠病毒科(*Reoviridae*)	斐济病毒属(*Fijivirus*)	窄	pp	ic	1
	水稻病毒属(*Oryzavirus*)	窄	pp	ic	1
	植物呼肠病毒属(*Phytoreovirus*)	宽-窄	lp	ic	1
双分病毒科(*Partitiviridae*)	α 隐潜病毒属(*Alphacryptovirus*)	窄	s	i	2
	β 隐潜病毒属(*Betacryptovirus*)	窄	s	i	2
弹状病毒科(*Rhabdoviridae*)	细胞质弹状病毒属(*Cytorhabdovirus*)	窄	lp，ap	bc	1
	细胞核弹状病毒属(*Nucleorhabdovirus*)	窄	lp，ap	bc	1
	未归属的弹状病毒(Unassigned)	窄	lp，ap，mtp	bc	1
布尼亚病毒科(*Bunyaviridae*)	番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*)	宽	tp	ic	3
蛇状病毒科(*Ophioviridae*)**	蛇状病毒属(*Ophiovirus*)	窄	u	fl*	3
未归科的悬浮属	纤细病毒属(*Tenuivirus*)	窄	pp	fl	4
	巨脉病毒属(*Varicosavirus*)	窄-中	f	r	2
雀麦花叶病毒科(*Bromoviridae*)	雀麦花叶病毒属(*Bromovirus*)	窄	u	i	3
	黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*)	窄-宽	an	i	3
	苜蓿花叶病毒属(*Alfamovirus*)	宽	an	b	3
	等轴不稳环斑病毒属(*Ilarvirus*)	窄	s	(i)	3
	油橄榄病毒属(*Oleavirus*)	窄	u	b	3
豇豆花叶病毒科(*Comoviridae*)	豇豆花叶病毒属(*Comovirus*)	窄	b	i	2
	蚕豆病毒属(*Fabavirus*)	宽	an	i	2
	线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*)	窄-宽	n	i	2
马铃薯 Y 病毒科(*Potyviridae*)	马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)	窄-中	an，s	f	1
	甘薯病毒属(*Ipomovirus*)	宽	w	f	1
	柘橙病毒属(*Macluravirus*)	窄	an	f	1
	黑麦草花叶病毒属(*Rymovirus*)	窄	mt	f	1
	小麦花叶病毒属 (*Tritimovirus*)	窄	Mt	f	1
	大麦黄花叶病毒属(*Bymovirus*)	窄	f	f	2
番茄丛矮病毒科(*Tombusviridae*)	番茄丛矮病毒属(*Tombusvirus*)	窄	u，s，f	i	1
	绿萝病毒属(*Aureusvirus*)	窄	u	i	1
	燕麦病毒属(*Avenavirus*)	窄	u	i	1
	香石竹斑驳病毒属(*Carmovirus*)	窄	u，s，f	i	1

续表

科	属	寄主范围[a]	传播介体[b]	粒体形态[c]	核蛋白粒体数[d]
	香石竹病毒属(*Dianthovirus*)	中	u	i	1
	玉米褪绿斑驳病毒属(*Machlomovirus*)	窄	s	i	1
	坏死病毒属(*Necrovirus*)	宽	f	i	1
	黍病毒属(*Panicovirus*)	窄	u	i	1
伴生病毒科(*Sequiviridae*)	伴生病毒属(*Sequivirus*)	窄	as	i	1
	矮化病毒属(*Waikavirus*)	窄	ls	i	1
长线病毒科(*Closteroviridae*)	长线病毒属(*Closterovirus*)	窄	as, w, m	f	1
	毛形病毒属(*Crinivirus*)	宽	w	f	2
	葡萄卷叶病毒属(*Ampelovirus*)**	窄	ms	f	1
黄症病毒科(*Luteoviridae*)	黄症病毒属(*Luteovirus*)	窄	ac	i	1
	马铃薯卷叶病毒属(*Polerovirus*)	窄	ac	i	1
	耳突花叶病毒属(*Enamovirus*)	窄	ac	i	1
	未归属的黄症科病毒(Unassigned)	窄	ac	i	1
曲线病毒科(*Flexiviridae*)**	马铃薯X病毒属(*Potexvirus*)	窄	c	f	1
	香石竹潜隐病毒属(*Carlavirus*)	窄-中	as, w, s, c	f	1
	凹陷病毒属(*Foveavirus*)	窄	u	f	1
	葱X病毒属(*Allexivirus*)	窄	mt	f	1
	发样病毒属(*Capillovirus*)	窄	s	f	1
	纤毛病毒属(*Trichovirus*)	窄	s	f	1
	葡萄病毒属(*Vitivirus*)	窄-中	as, h, m, sc	f	1
	柑橘病毒属(*Mandarivirus*)**	窄	u, c	f	1
芜菁黄花叶病毒科(*Tymoviridae*)	芜菁黄花叶病毒属(*Tymovirus*)	窄	b	i	1
	玉米细条病毒属(*Marafivirus*)	窄	lp	i	1
	斑点病毒属(*Maculavirus*)**	窄	u	i	1
未归科的悬浮属	烟草脆裂病毒属(*Tobravirus*)	宽	n	r	2
	烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)	中	c	r	1
	大麦病毒属(*Hordeivirus*)	窄	c, s	r	3
	真菌传杆状病毒属(*Furovirus*)	窄	f	r	2
	马铃薯帚顶病毒属(*Pomovirus*)	窄	f	r	2
	花生丛簇病毒属(*Pecluvirus*)	窄	f, s	r	2
	甜菜坏死黄脉病毒属(*Benyvirus*)	窄	f	r	4
	蜜柑矮缩病毒属(*Saduavirus*)	窄-宽	n, an, s	i	2
	南方菜豆花叶病毒属(*Sobemovirus*)	窄	b, s	i	1
	樱桃锉叶病毒属(*Cheravirus*)	窄-宽	n, s	i	2
	悬钩子病毒属(*Idaeovirus*)	窄-宽	s	i	2
	欧尔密病毒属(*Ourmiavirus*)	中	u	b	3
	幽影病毒属(*Umbravirus*)	窄	h	ih	1

注:a 寄主范围:"窄"表示只有1～5种自然寄主;"中"表示有6～20种自然寄主;"宽"表示有20种以上自然寄主。

b 传播介体:ac, 蚜虫,巡回型; an, 蚜虫,非持久性; ap, 蚜虫,增殖型; as, 蚜虫,半持久性; b, 甲虫; c, 接触(机械方式); f, 真菌; h, 需要一种辅助病毒,通常为黄症病毒; lc, 叶蝉,巡回型; lh, 叶蝉且需要一种辅助病毒; lp, 叶蝉,增殖型; ls, 叶蝉,半持久性; m, 粉蚧; ms, 粉蚧, 半持久性; mt, 螨类; mtp, 螨类,增殖型; n, 线虫; pp, 飞虱,增殖型; s, 种子; sc, 蚧(介壳虫); th, 角蝉; tp, 蓟马; u, 未知; w, 粉虱。

c 粒体形态:b,杆菌状; bc, 复杂的杆菌状; f', 柔条线状; fl', 柔条线状,但可能是复杂的粒体; g, 双联体状; i, 等经球状; (i), 可能为等经球状; ic, 复杂的等经球状; ih,由辅助病毒包壳,呈现等经球状; r, 直杆状。

d 完成侵染循环所需的、含有不同基因组片段的各类核蛋白粒体的数目。

承蒙许可,数据引自 van Regenmortel 等(2000)(ICTV 第七次报告)。

** 来自ICTV第八次报告的新资料[见:Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J. Desselberger, U. and Ball, L. A. (2005). Virus Taxonomy--Classification and Nomenclature of Viruses;Eighth Report of ICTV. Elsevier Academic Press, Amsterdam.]或最近刚发表的关于病毒分类的新文章——译者。

附录 2C*

植物病毒与类病毒的科、属名称

科或属名	中文译名	科　名
Alfamovirus	苜蓿花叶病毒属	*Bromoviridae*
Allexivirus	葱 X 病毒属	*Flexiviridae*
Alphacryptovirus	α 隐潜病毒属	*Partitiviridae*
Ampelovirus	葡萄卷叶病毒属	*Closteroviridae*
Apscaviroid	苹果锈果类病毒属	*Pospiviroidae*
Aureusvirus	绿萝病毒属	*Tombusviridae*
Avenavirus	燕麦病毒属	*Tombusviridae*
Avsunviroid	鳄梨日斑类病毒属	*Avsunviroidae*
Avsunviroidae	鳄梨日斑类病毒科	
Babuvirus	香蕉束顶病毒属	*Nanoviridae*
Badnavirus	杆状 DNA 病毒属	*Caulimoviridae*
Begomovirus	菜豆金色花叶病毒属	*Geminiviridae*
Benyvirus	甜菜坏死黄脉病毒属	
Betacryptovirus	β 隐潜病毒属	*Partitiviridae*
Bromoviridae	雀麦花叶病毒科	
Bromovirus	雀麦花叶病毒属	*Bromoviridae*
Bunyaviridae	布尼亚病毒科	
Bymovirus	大麦黄花叶病毒属	*Potyviridae*
Capillovirus	发样病毒属	*Flexiviridae*
Carlavirus	香石竹潜隐病毒属	*Flexiviridae*
Carmovirus	香石竹斑驳病毒属	*Tombusviridae*
Caulimoviridae	花椰菜花叶病毒科	
Caulimovirus	花椰菜花叶病毒属	*Caulimoviridae*
Cavemovirus	木薯脉花叶病毒属	*Caulimoviridae*
Cheravirus	樱桃锉叶病毒属	
Citrivirus	柑橘叶斑病毒属	*Flexiviridae*
Closteroviridae	长线病毒科	
Closterovirus	长线病毒属	*Closteroviridae*
Cocadviroid	椰子死亡类病毒属	*Pospiviroidae*
Coleviroid	锦紫苏类病毒属	*Pospiviroidae*
Comoviridae	豇豆花叶病毒科	
Comovirus	豇豆花叶病毒属	*Comoviridae*
Crinivirus	毛形病毒属	*Closteroviridae*
Cucumovirus	黄瓜花叶病毒属	*Bromoviridae*
Curtovirus	曲顶病毒属	*Geminiviridae*
Cytorhabdovirus	细胞质弹状病毒属	*Rhabdoviridae*
Dianthovirus	香石竹病毒属	*Tombusviridae*
Elaviroid	茄潜隐类病毒属	*Avsunviroidae*

续表

科或属名	中文译名	科　名
Enamovirus	耳突花叶病毒属	*Luteoviridae*
Fabavirus	蚕豆病毒属	*Comoviridae*
Fijivirus	斐济病毒属	*Reoviridae*
Flexiviridae	曲线病毒科	
Foveavirus	凹陷病毒属	*Flexiviridae*
Furovirus	真菌传杆状病毒属	
Geminiviridae	双生(或联体)病毒科	
Hordeivirus	大麦病毒属	
Hostuviroid	啤酒花矮化类病毒属	*Pospiviroidae*
Idaeovirus	悬钩子病毒属	
Ilarvirus	等轴不稳环斑病毒属	*Bromoviridae*
Ipomovirus	甘薯病毒属	*Potyviridae*
Luteoviridae	黄症病毒科	
Luteovirus	黄症病毒属	*Luteoviridae*
Machlomovirus	玉米褪绿斑驳病毒属	*Tombusviridae*
Macluravirus	柘橙病毒属	*Potyviridae*
Maculavirus	斑点病毒属	*Tymoviridae*
Mandarivirus	柑橘病毒属	*Flexiviridae*
Marafivirus	玉米细条病毒属	*Tymoviridae*
Mastrevirus	玉米线条病毒属	*Geminiviridae*
Metaviridae	转座病毒科	
Metavirus	转座病毒属	*Metaviridae*
Nanoviridae	矮缩病毒科	
Nanovirus	矮缩病毒属	*Nanoviridae*
Necrovirus	坏死病毒属	*Tombusviridae*
Nepovirus	线虫传多面体病毒属	*Comoviridae*
Nucleorhabdovirus	细胞核弹状病毒属	*Rhabdoviridae*
Oleavirus	油橄榄病毒属	*Bromoviridae*
Ophioviridae	蛇状病毒科	
Ophiovirus	蛇状病毒属	
Oryzavirus	水稻病毒属	*Reoviridae*
Ourmiavirus	欧尔密病毒属	
Panicovirus	黍病毒属	*Tombusviridae*
Partitiviridae	双分病毒科	
Pecluvirus	花生丛簇病毒属	
Pelamoviroid	桃潜隐花叶类病毒属	*Avsunviroidae*
Petuvirus	碧冬茄明脉病毒属	*Caulimoviridae*
Phytoreovirus	植物呼肠病毒属	*Reoviridae*
Polerovirus	马铃薯卷叶病毒属	*Luteoviridae*
Pomovirus	马铃薯帚顶病毒属	
Pospiviroid	马铃薯纺锤块茎类病毒属	*Pospiviroidae*
Pospiviroidae	马铃薯纺锤块茎类病毒科	
Potexvirus	马铃薯 X 病毒属	*Flexiviridae*

续表

科或属名	中文译名	科　名
Potyviridae	马铃薯Y病毒科	
Potyvirus	马铃薯Y病毒属	*Potyviridae*
Pseudoviridae	伪病毒科	
Pseudovirus	伪病毒属	*Pseudoviridae*
Reoviridae	呼肠(孤)病毒科	
Rhabdoviridae	弹状病毒科	
Rymovirus	黑麦草花叶病毒属	*Potyviridae*
Sadwavirus	蜜柑矮缩病毒属	
Sequiviridae	伴生病毒科	
Sequivirus	伴生病毒属	*Sequiviridae*
Sirevirus	塞尔病毒属	*Pseudoviridae*
Sobemovirus	南方菜豆花叶病毒属	
Soymovirus	大豆斑驳病毒属	*Caulimoviridae*
Tenuivirus	纤细病毒属	
Tobamovirus	烟草花叶病毒属	
Tobravirus	烟草脆裂病毒属	
Tombusviridae	番茄丛矮病毒科	
Tombusvirus	番茄丛矮病毒属	*Tombusviridae*
Topocuvirus	番茄伪曲顶病毒属	*Geminiviridae*
Tospovirus	番茄斑萎病毒属	*Bunyaviridae*
Trichovirus	纤毛病毒属	*Flexiviridae*
Tritimovirus	小麦花叶病毒属	*Potyviridae*
Tungrovirus	东格鲁病毒属	*Caulimoviridae*
Tymoviridae	芜菁黄花叶病毒科	
Tymovirus	芜菁黄花叶病毒属	*Tymoviridae*
Umbravirus	幽影病毒属	
Varicosavirus	巨脉病毒属	
Vitivirus	葡萄病毒属	*Flexiviridae*
Waikavirus	矮化病毒属	*Sequiviridae*

* 为了方便读者查阅病毒科、属名称，特附此表，以便按字母顺序搜索科、属，有关各病毒科、属的具体情况请参见附录2A与2B。——译者。

附录3　有关植物病毒的信息来源

1. 期刊

下列名单包括了定期刊登与植物病毒学相关的原始论文与综述的主要刊物：

(1)核心期刊

Intervirology

Journal of General Virology

Journal of Virology

Journal of Virological Methods

Virology

(2)主要发表偏向于应用方面论文的期刊

Annals of Applied Biology

Annals of the Phytopathological Society of Japan

European Journal of Plant Pathology(前身为 *Netherlands Journal of Plant Pathology*)

Phytopathology

Plant Disease

Plant Pathology

(3)经常发表偏向于基础植物病毒学相关论文的期刊

Archives of Virology

Cell

EMBO Journal

FEBS Letters

Journal of Molecular Biology

Molecular Plant-Microbe Interactions

Molecular Plant Pathology

Nature

Physiological and Molecular Plant Pathology

Plant Cell

Plant Journal

Plant Molecular Biology

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA

Science

Virus Genes

Virus Research

(4)综述性期刊

Advances in Disease Vector Research

Advances in Virus Research

Annual Review of Biochemistry

Annual Review of Entomology

Annual Review of Microbiology

Annual Review of Phytopathology

Annual Review of Plant Biology(前身为*Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*)

2. 计算机网址

许多计算机网址维持时间较短，然而，"All the Virology on the WWW"(http://www.tulane.edu/~dmsander/garryfavweb.html)这个网址已经维持了多年，并且与许多有用的网址相链接。病毒分类学数据库网址：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Viruses

3. 信息纵览

(1)国际病毒分类委员会(ICTV)的报告综合了包括植物病毒的所有病毒的信息。该报告大约每4年出版一次。ICTV数据库(ICTVdb)网址：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/ICTVindex.htm 或 ICTV 数据库(ICTVdb)中国镜像网址：http://ictvdb.mirror.ac.cn/

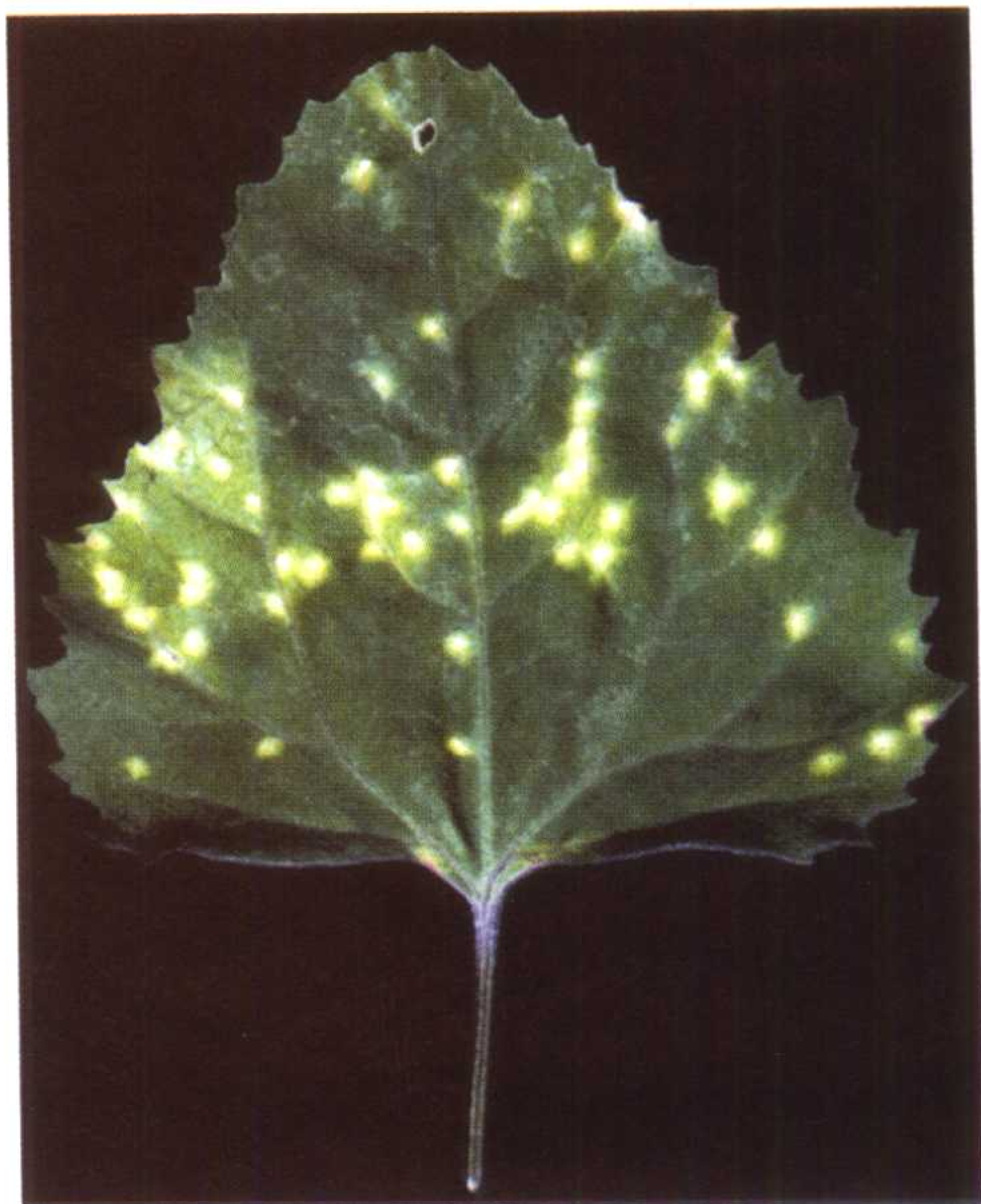
(2)应用生物学家协会(Association of Applied Biologists，AAB)从1970年至1989年陆续出版了《植物病毒志(Descriptions of Plant Viruses)》，该系列出版物不断得到更新，并以光盘(CD-ROM)形式出售。有关信息可以从下列地址获得：Association of Applied Biologists, c/o Horticulture Research International, Wellesbourne, Warwick CV35 9EF, UK(e-mail:dpv.aab@hri.ac.uk)。

(3)各种作物病害的数字图像集可以从美国植物病理学会(American Phytopathological Society, APS)的网上书店(www.shopapspress.org)获得。

中文索引

英文索引

(A)



(B)



图 3.1　昆诺藜（*Chenopodium quinoa*）叶片上的局部褪绿斑（chlorotic local lesion）。（A）BYMV 导致的大型褪绿斑逐渐坏死。叶尖部的小孔表明这是接种叶。承蒙 A. Brunt 提供该照片，谨致谢意。（B）GRV 诱发的细小的褪绿斑。承蒙应用生物学家协会（Association of Applied Biologists，AAB)同意使用该照片，谨致谢意。

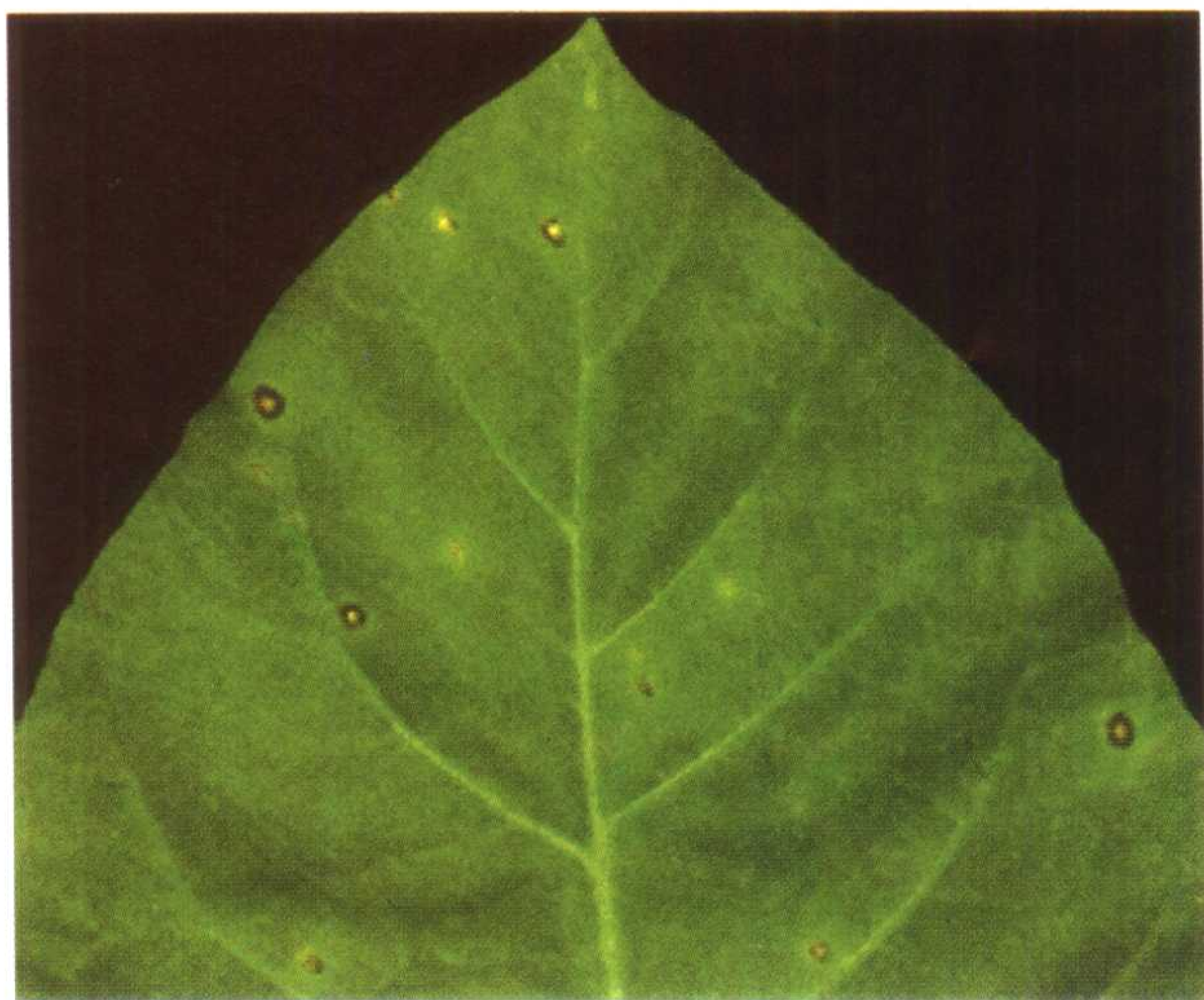


图 3.2　TMV 在含 *N* 基因的烟草（*Nicotiana tabacum* NN）上诱发的局部坏死斑（necrotic local lesion）。承蒙 AAB 同意使用该照片，谨致谢意。



图 3.3　ToRSV 在烟草（*Nicotiana tabacum*）接种叶上诱发的坏死环斑（necrotic ringspot）。

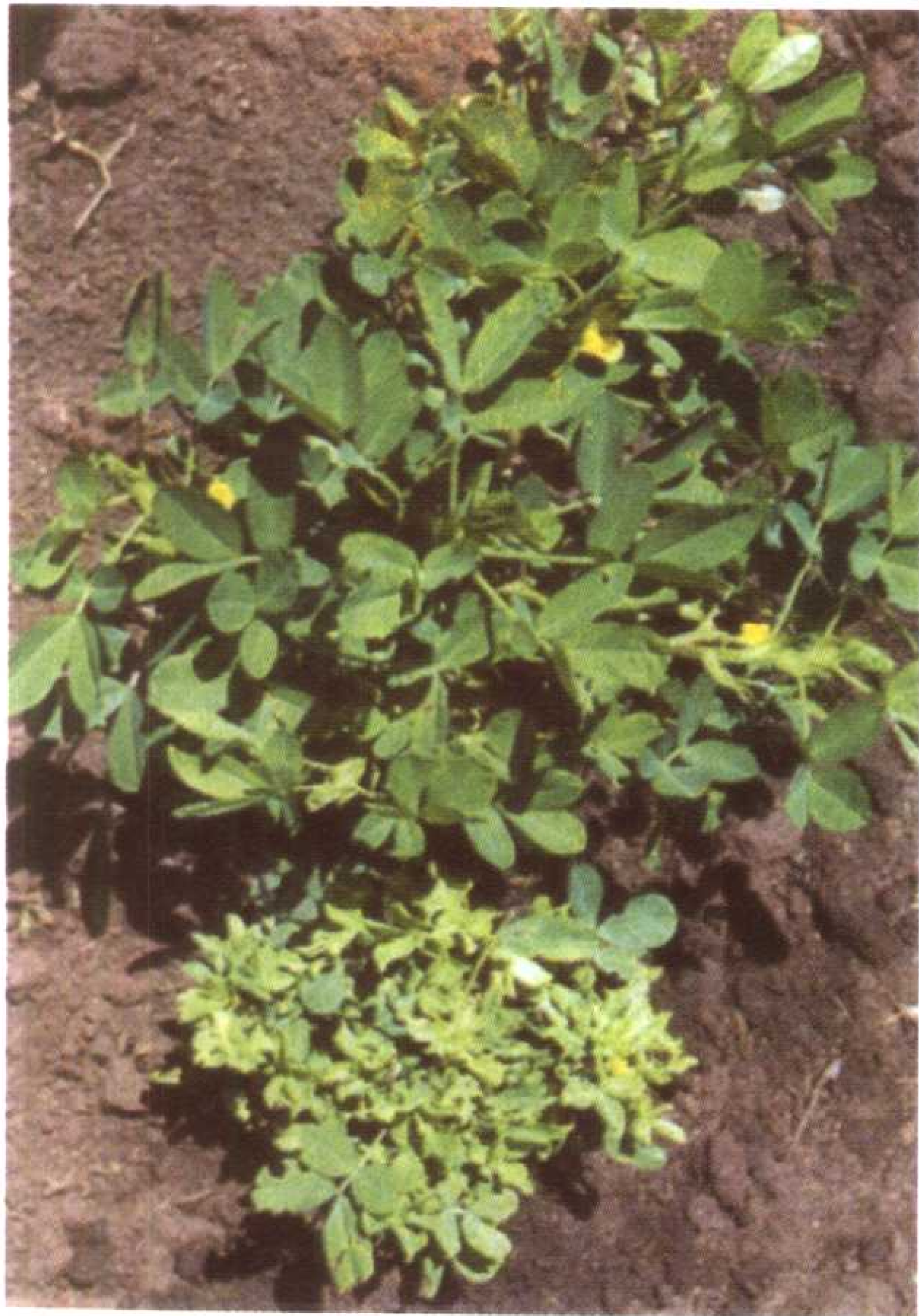


图 3.4 花生丛簇病毒病（groundnut rosette virus disease）对花生（*Arachis hypogea*）植株大小的影响。上部为健康植株，下部为受侵染的植株。承蒙 AAB 同意使用该照片，谨致谢意。



图 3.5 接种 TMV 三周后在烟草（*Nicotiana tabacum*）品种 Samsun（三生烟）上诱发的系统性花叶症状。承蒙 AAB 同意使用该照片，谨致谢意。



图 3.6 TYMV 在白菜上诱发的褪绿花叶。



图 3.7 一种 AbMV 的西印度群岛分离物在斑叶苘麻（*Abutilon sellovianum* var. *marmorata*）上诱发的特定区域的褪绿花叶与深绿色块症状。承蒙 AAB 同意使用该照片，谨致谢意。



图 3.8　CMV 在小西葫芦（zucchini）植株上诱发的非典型的花叶症状。



图 3.9　GRV 与一种卫星 RNA 共同在本生烟（*Nicotiana benthamiana*）植株上诱发的褪绿镶脉（chlorotic vein-banding）症状。承蒙 AAB 同意使用该照片，谨致谢意。



图 3.10　MSV 在田间受侵染的玉米植株上诱发的典型的褪绿条斑（chlorotic streak）症状。



图 3.11　TBV 侵染导致的郁金香花碎色症状，左边为健康的花，右边为受侵染的花。



图 3.12　TuMV 侵染导致的桂竹香（*Cheiranthus cheiri*）花碎色症状，左边为健康的花，右边为受侵染的花。



图 3.13　CMV 对小西葫芦果实的影响，左边为受侵染的果实，右边为健康的果实。此受侵染的果实是图版 3.8 中受 CMV 侵染的小西葫芦植株上长出来的。



图3.14　BYV在田间受侵染的甜菜植株叶片上诱发的早期黄脉蚀纹（yellow vein etching）症状。承蒙 AAB 同意使用该照片，谨致谢意。



图3.15　BYV在田间受侵染的甜菜植株叶片上诱发的后期黄化症状。承蒙AAB同意使用该照片，谨致谢意。



图 3.16　BLRV 在受侵染的蚕豆（*Vicia faba*）植株上诱发的卷叶（leafrolling）症状。注意该复叶上的小叶均向上卷。



图 3.17　TMV 的 Ullman 株系在克利夫兰烟（*Nicotiana clevelandii*）上导致的系统性环斑（ringspotting）症状。注意这些环斑（ringspot）正在扩展并相互融合。承蒙A. Brunt提供该照片，谨致谢意。



图 3.18　PRSV 在受侵染的木瓜果实上诱发的环斑症状。一些深绿色的环斑正发生坏死。

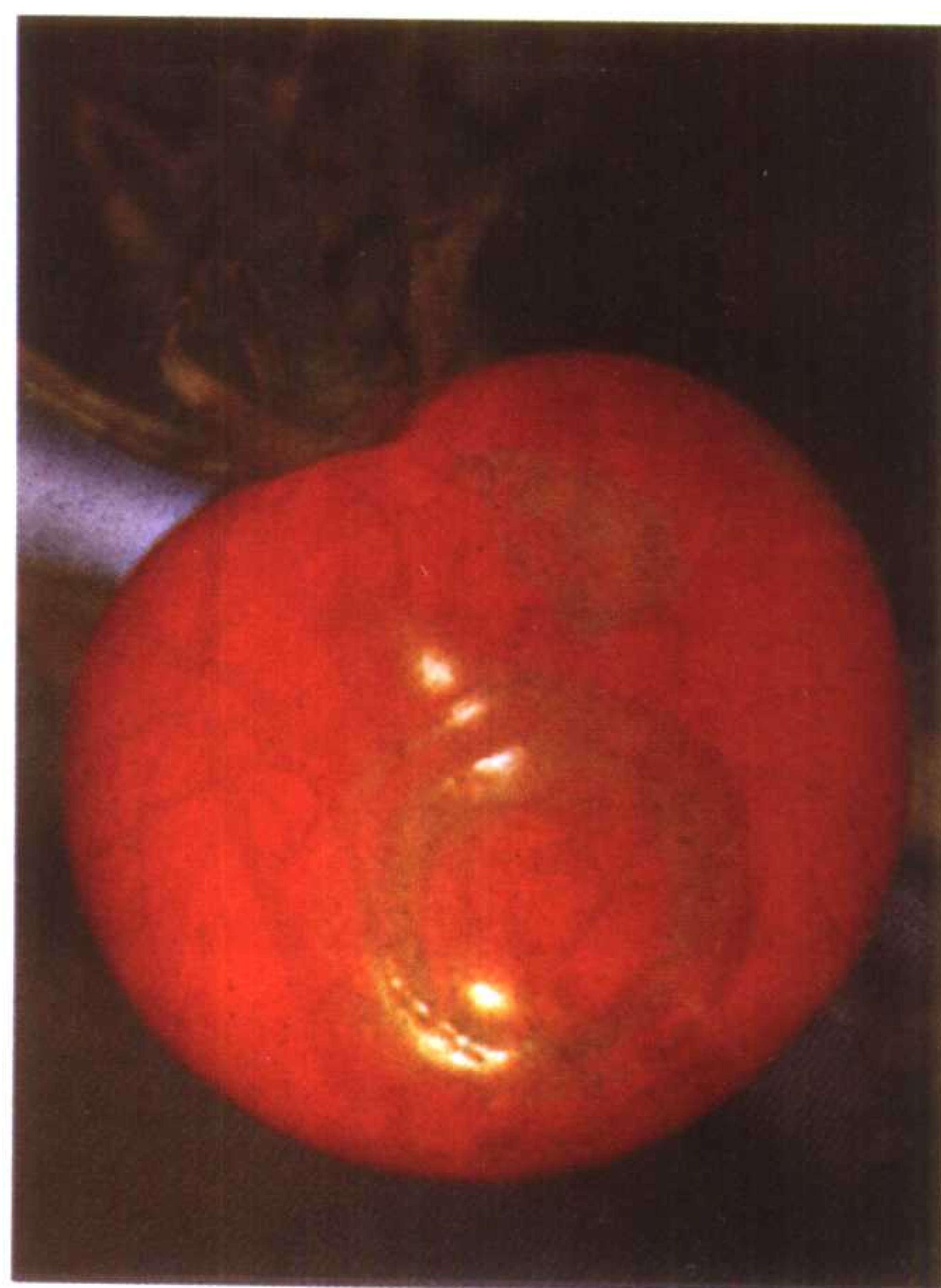


图 3.19　番茄条斑病（ToMV + PVX）在受侵染的番茄果实上诱发的坏死环斑症状。该果实采自图版 3.20 中的番茄植株。



图 3.20　番茄条斑病（ToMV + PVX）在受侵染的番茄植株上导致的严重茎坏死症状。该植株随后将倒伏并死亡。



图3.21　ACMV的乌干达变株在田间受侵染的木薯植株上导致的花叶与叶片畸形（deformation）。



图 3.22　番茄植株受 CMV 侵染后导致的叶片畸形。注意几个叶片已变成线条状。

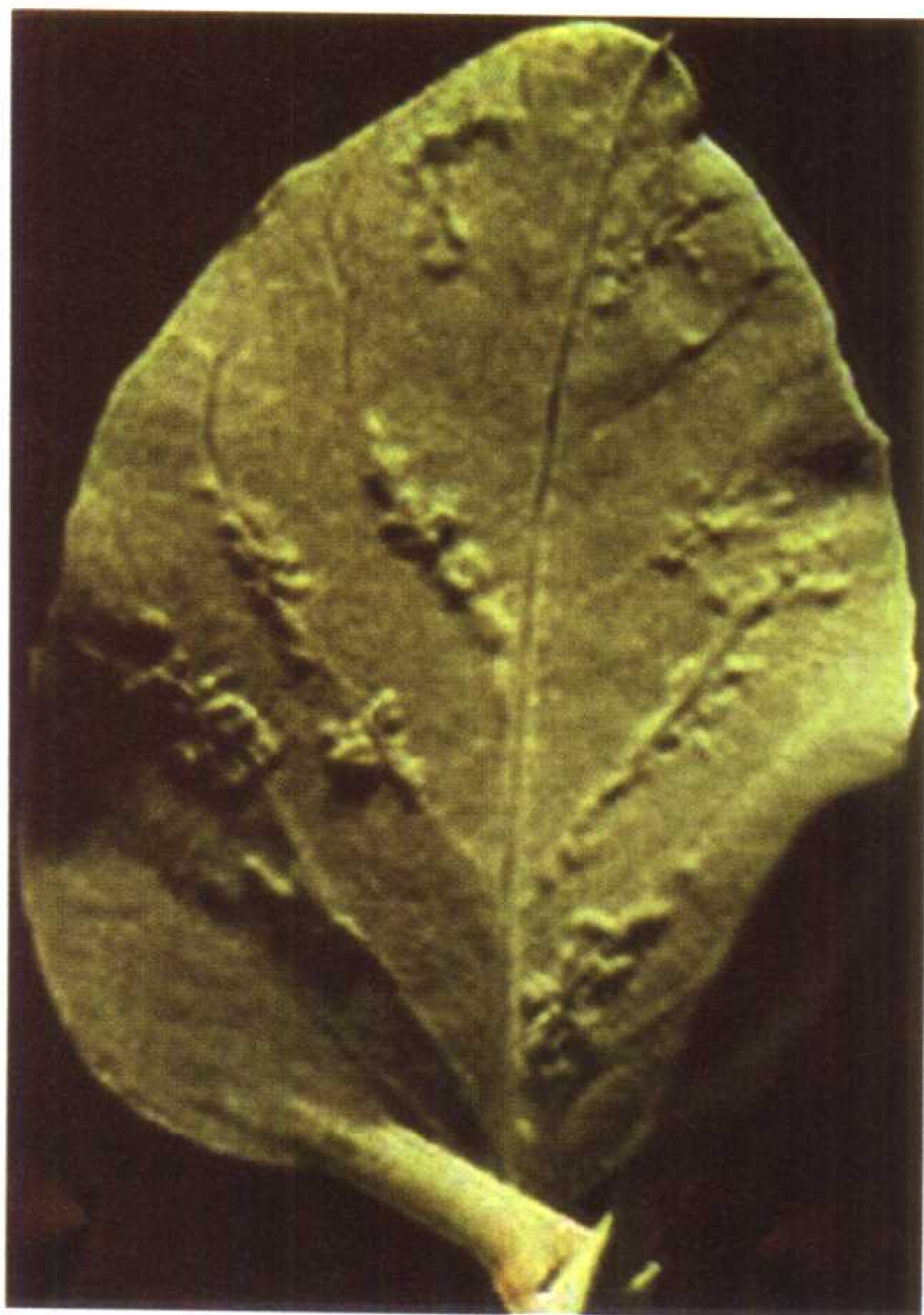


图 3.23　豌豆（*Pisum sativum*）受 PEMV 侵染后在叶片下面形成的耳突（enation）。注意这些突起（outgrowth）均长在叶脉上。承蒙 AAB 同意使用该照片，谨致谢意。



图 3.24　WTV 在白花草木樨（*Melilotus alba*）植株上导致的肿瘤（tumor）。注意肿瘤经常长在植株接近土壤表面的下胚轴处。



图 3.25　弗吉尼亚小苹果（Virginia Crab）受 ASGV 侵染的砧木（右边）嫁接部（graft union）的坏死与健康嫁接部（左边）的比较。承蒙 AAB 同意使用该照片，谨致谢意。



图 3.26　大蕉（plantain）植株受 BSV 侵染导致果束从假茎的侧面而非顶部长出。正在长出的非卷曲的叶片（顶叶）发生坏死。

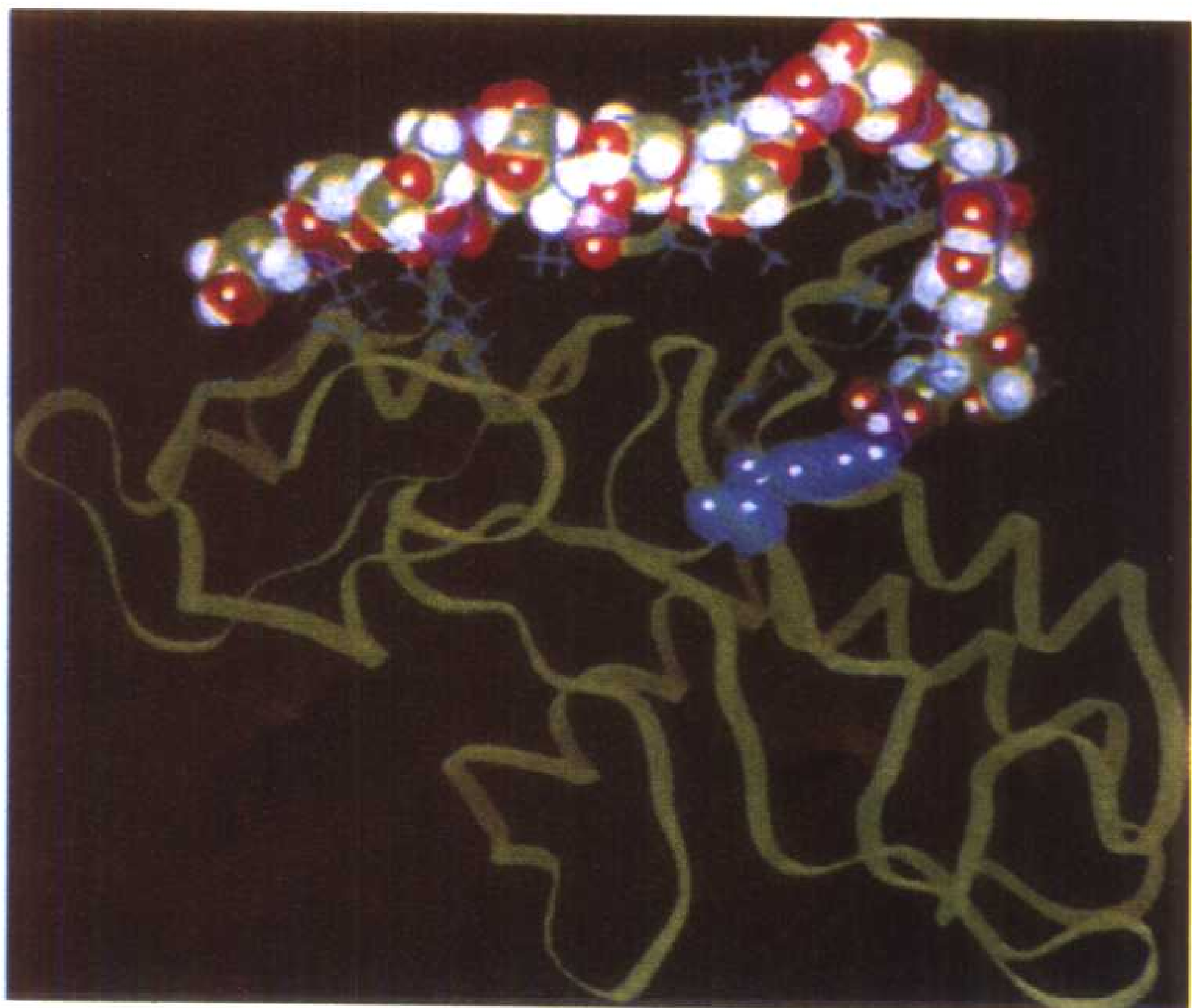


图 4.1　马铃薯 Y 病毒（PVY）的 VPg 与 RNA 片段相互作用的带状示意图。（见正文图 4.8 注）

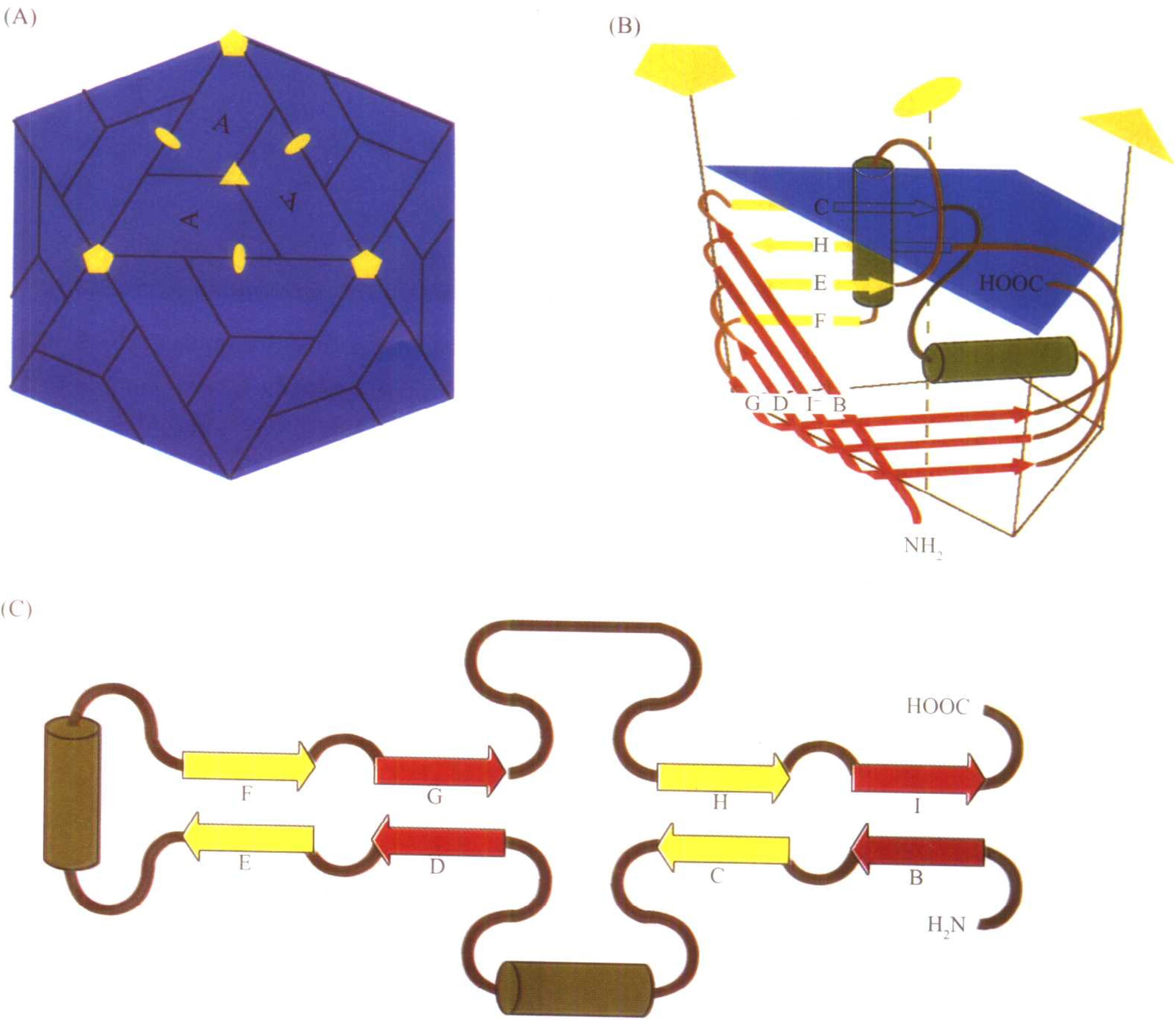


图 5.1　(A) 二十面体衣壳含有 60 个相同的蛋白亚基拷贝——蓝色标记为 A。(B) 存在于许多 RNA 和某些 DNA 病毒结构中的亚基结构单元的示意图。(C) 病毒 β 桶拓扑学显示 β 折叠链之间的连接(由黄色或红色箭头表示)以及 β 折叠链间的插入部分的位置。(见正文图 5.19 注)

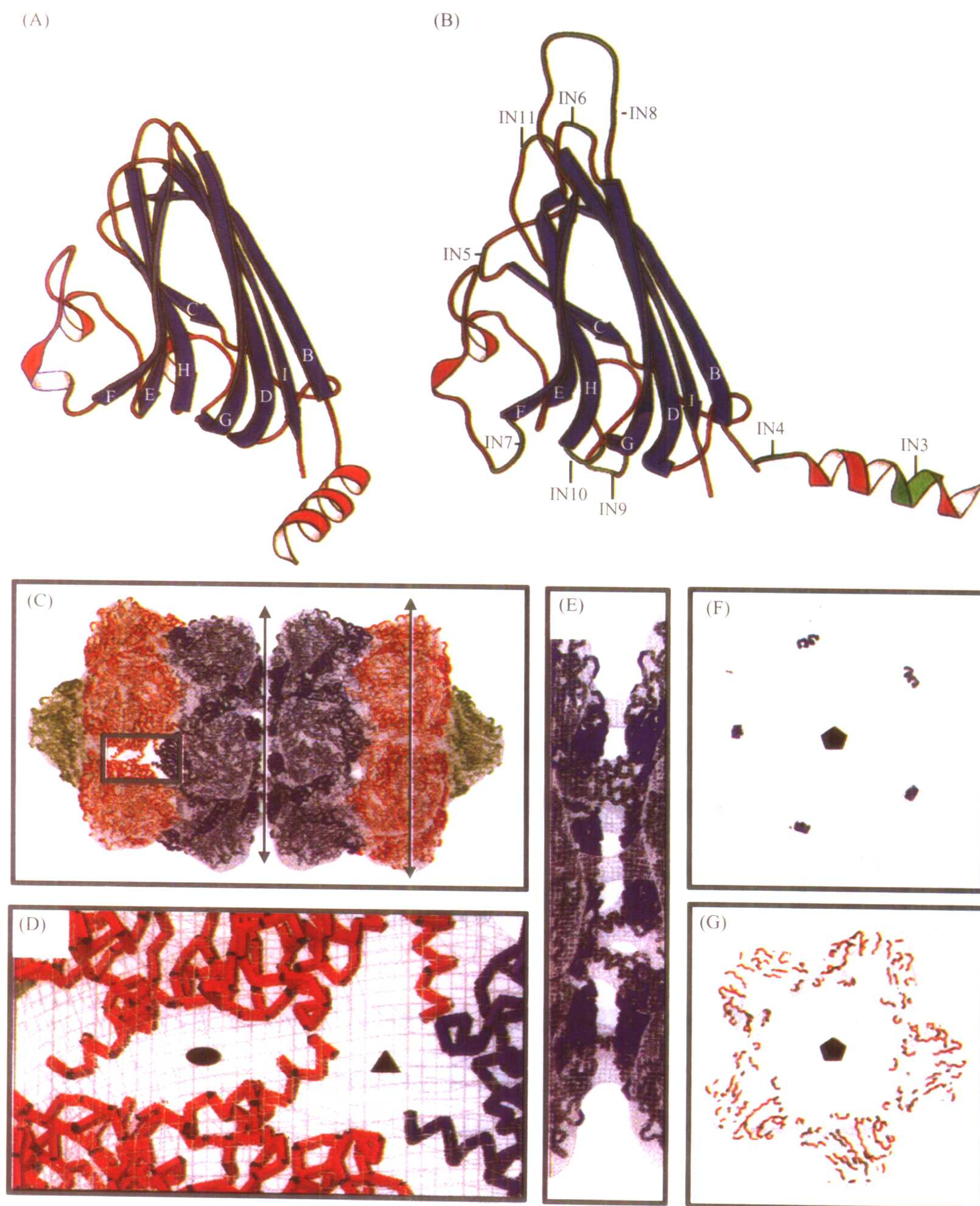


图 5.2 MSV-N 外壳蛋白和完整衣壳的模型。（见正文图 5.28 注）

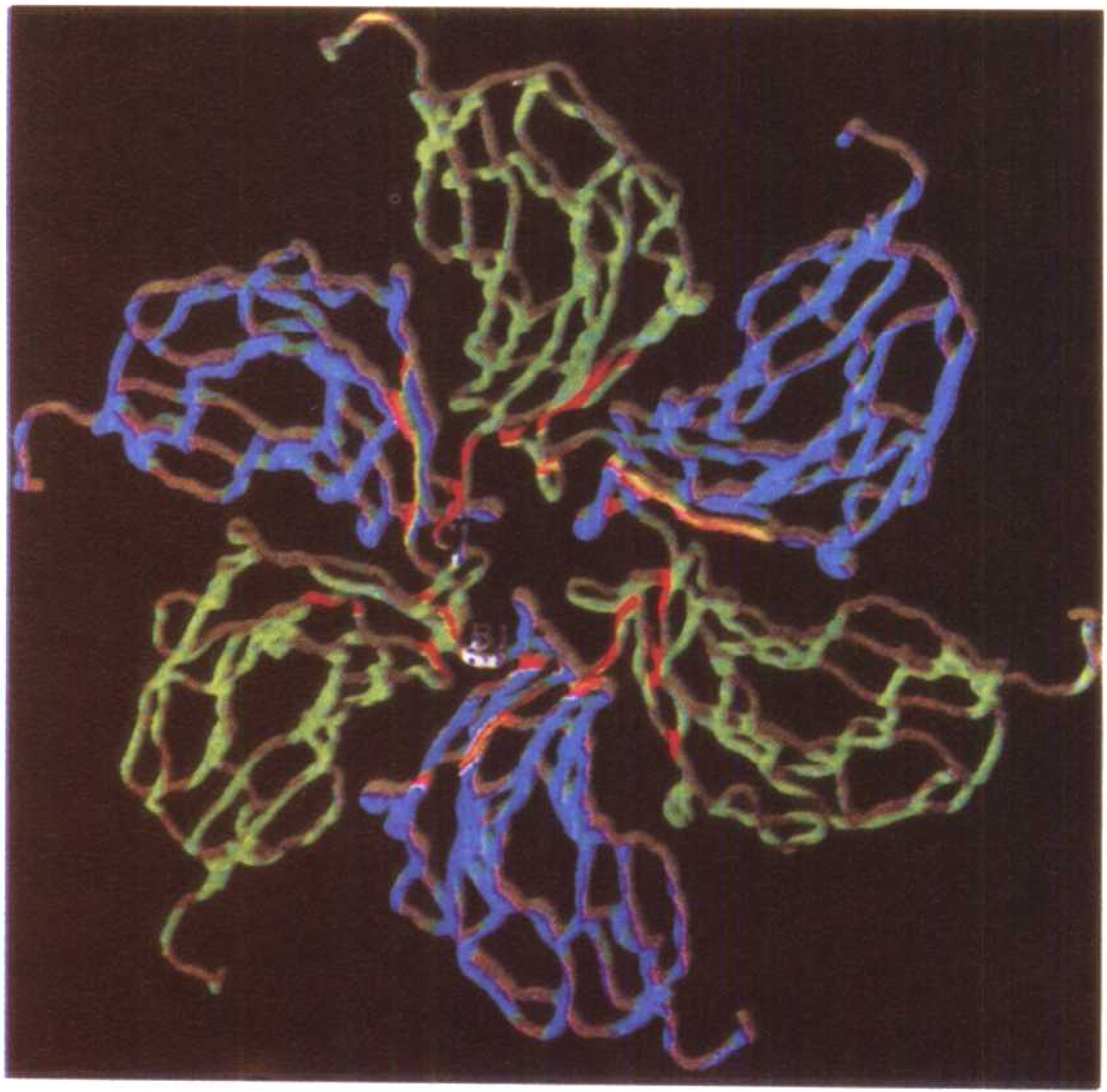


图 5.3　沿一准六重轴方向观察的图像。（见正文图 5.31 注）

□ 准六重互作

△ 准三重互作

◇ 准二重互作

- - - - - - 主链氢键

— — — — 盐桥

● 不可接近

● 可接近，外部

● 可接近，内部

图 5.4　TYMV B- 亚基的氢键、亚基间接触及可接近性的示意图。（见正文图 5.32 注）

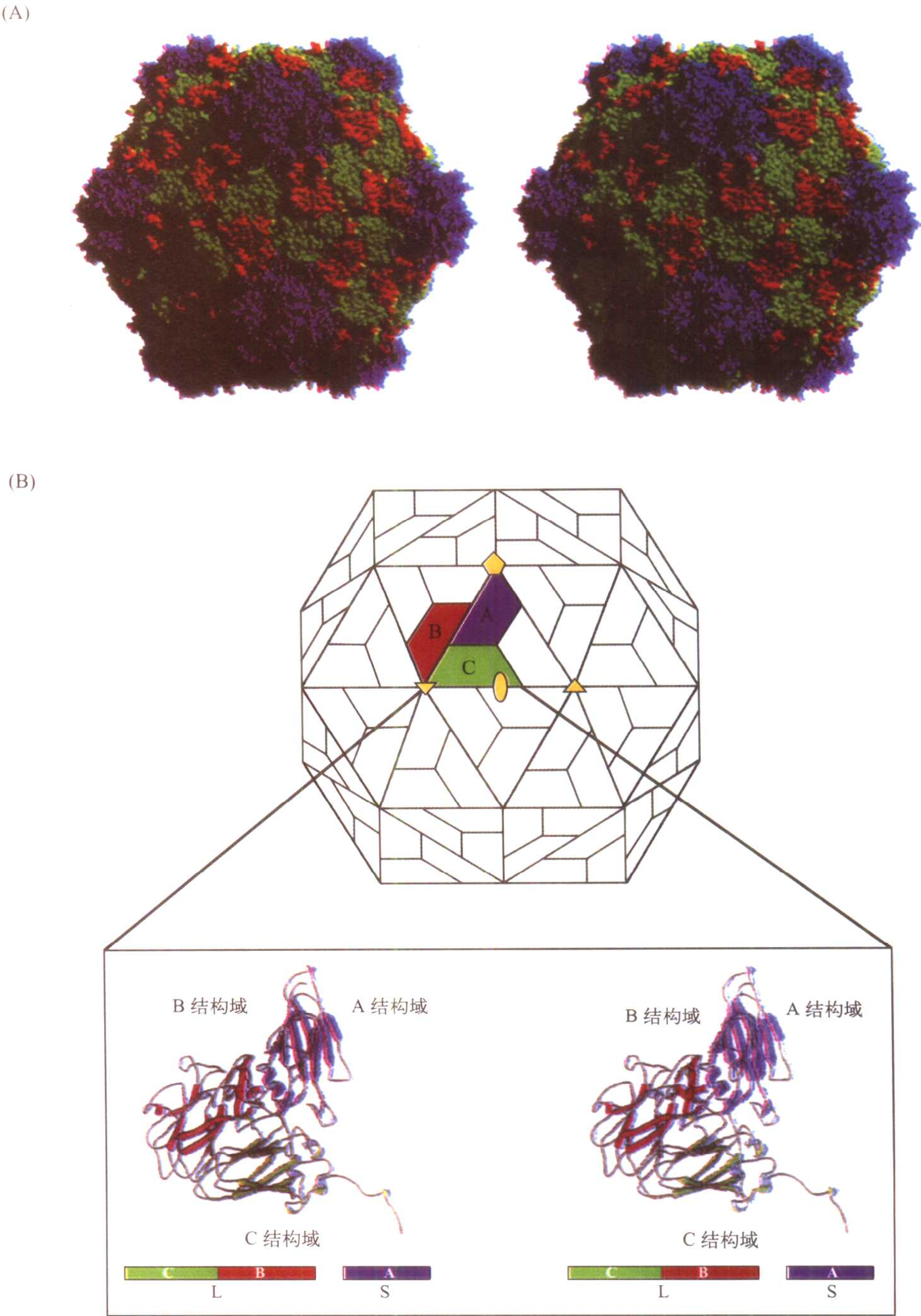


图 5.5　RCMV 病毒衣壳和二十面体非对称单位的结构。(见正文图 5.36 注)

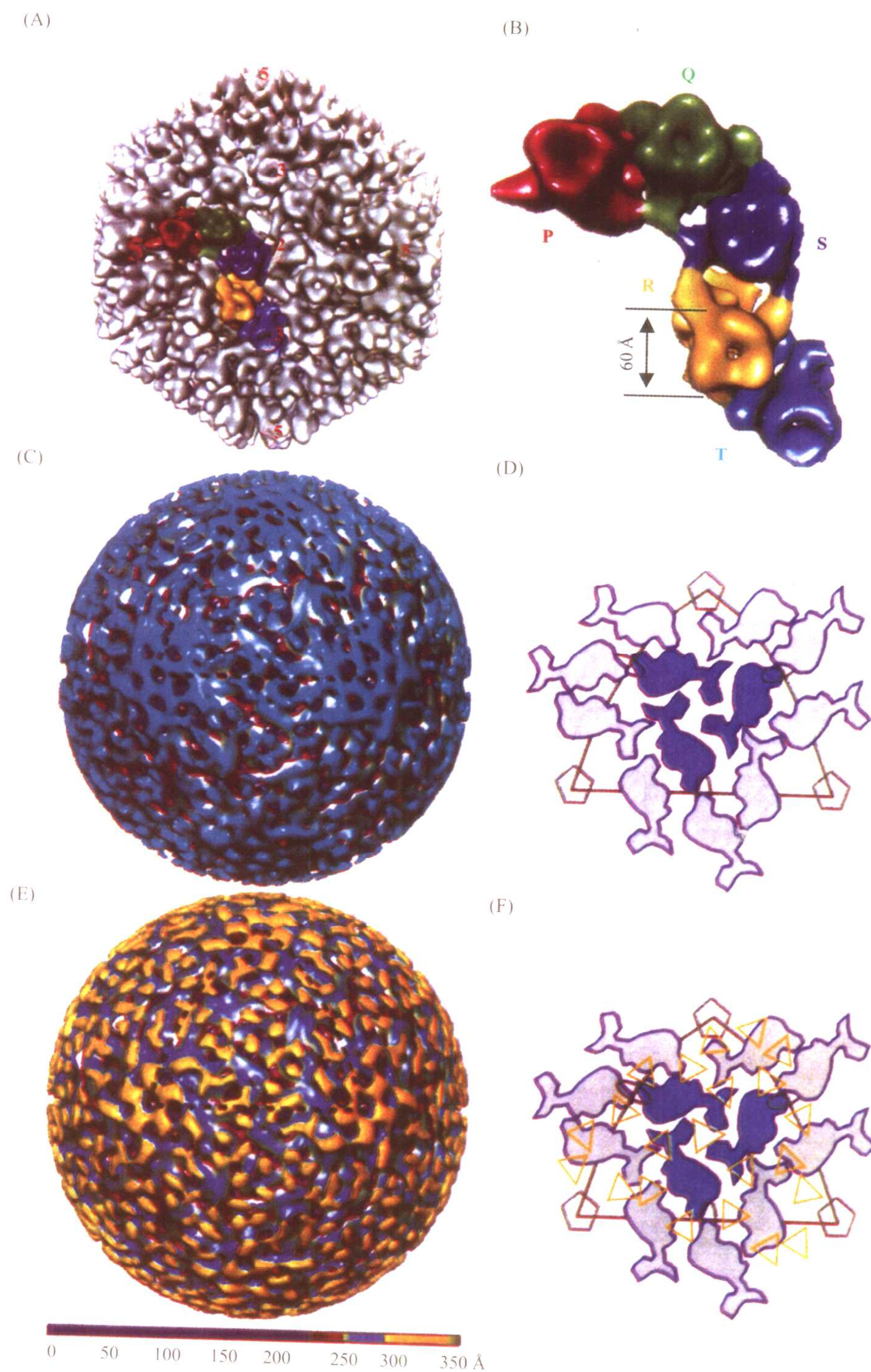


图 5.6　RDV 的结构。(见正文图 5.38 注)

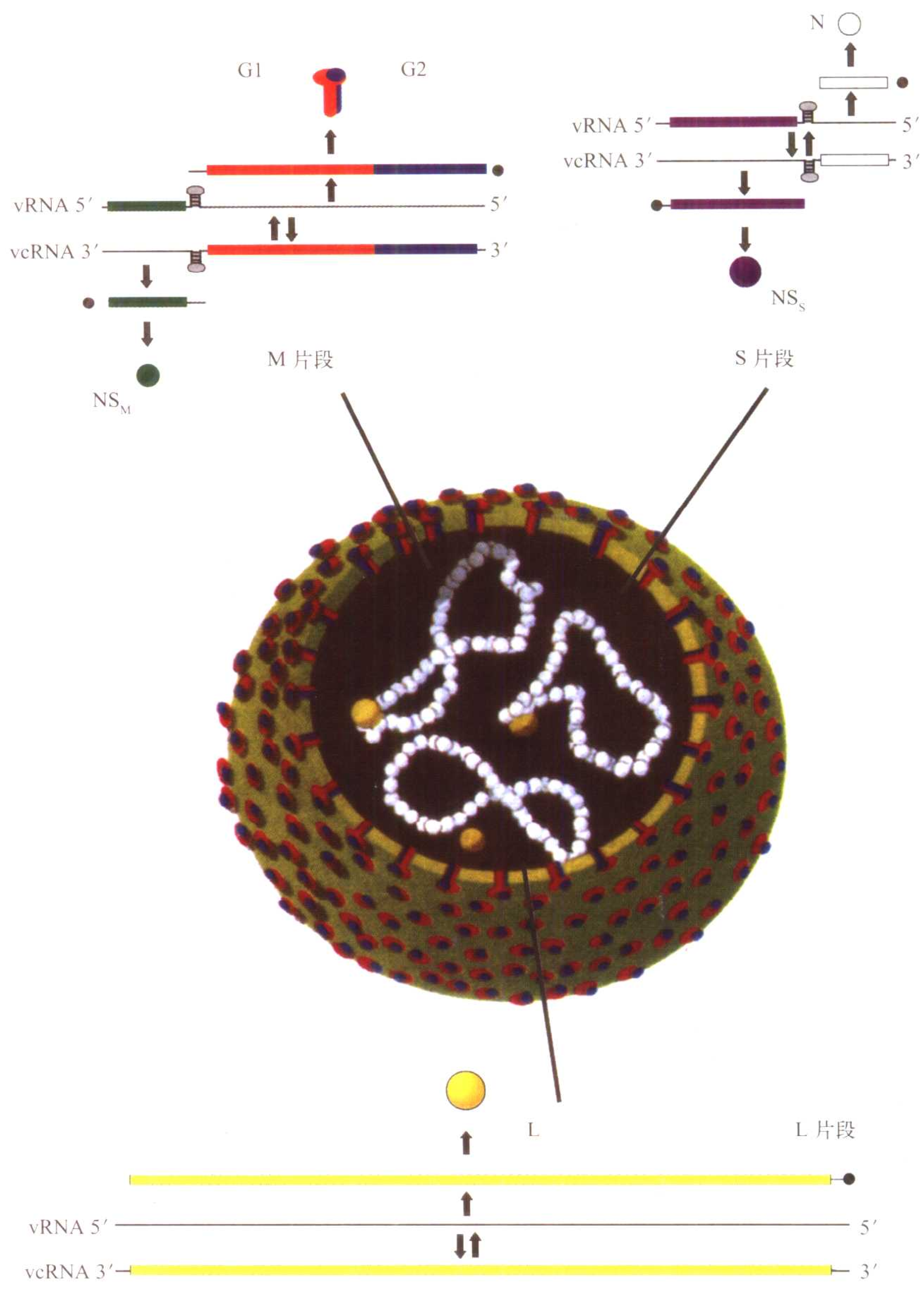


图 5.7　TSWV 的形态和基因组表达。(见正文图 5.42 注)

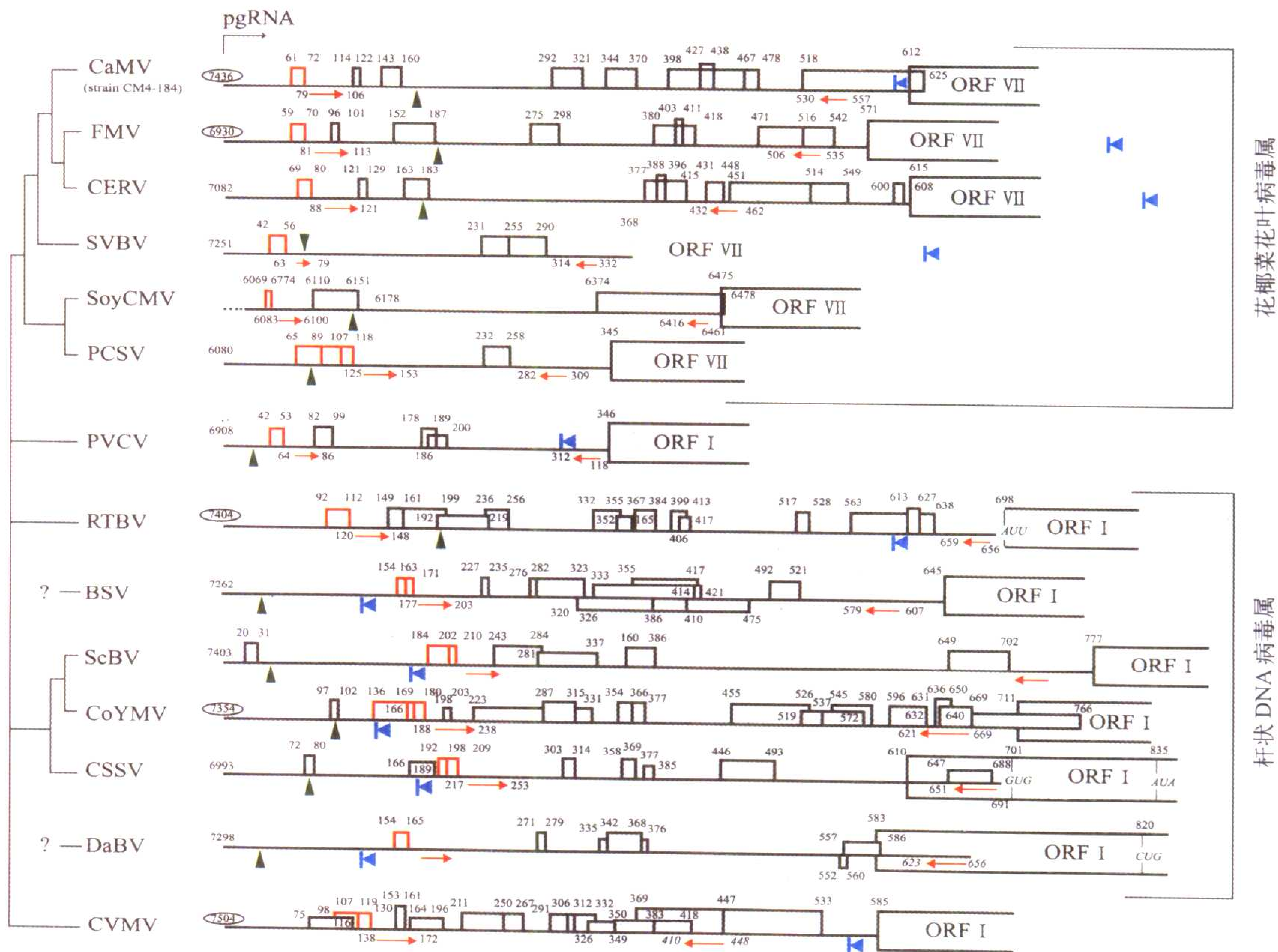


图 7.1　多种植物副反转录病毒前基因组（pg）RNA 的前导序列一级结构的比较。（见正文图 7.19 注）

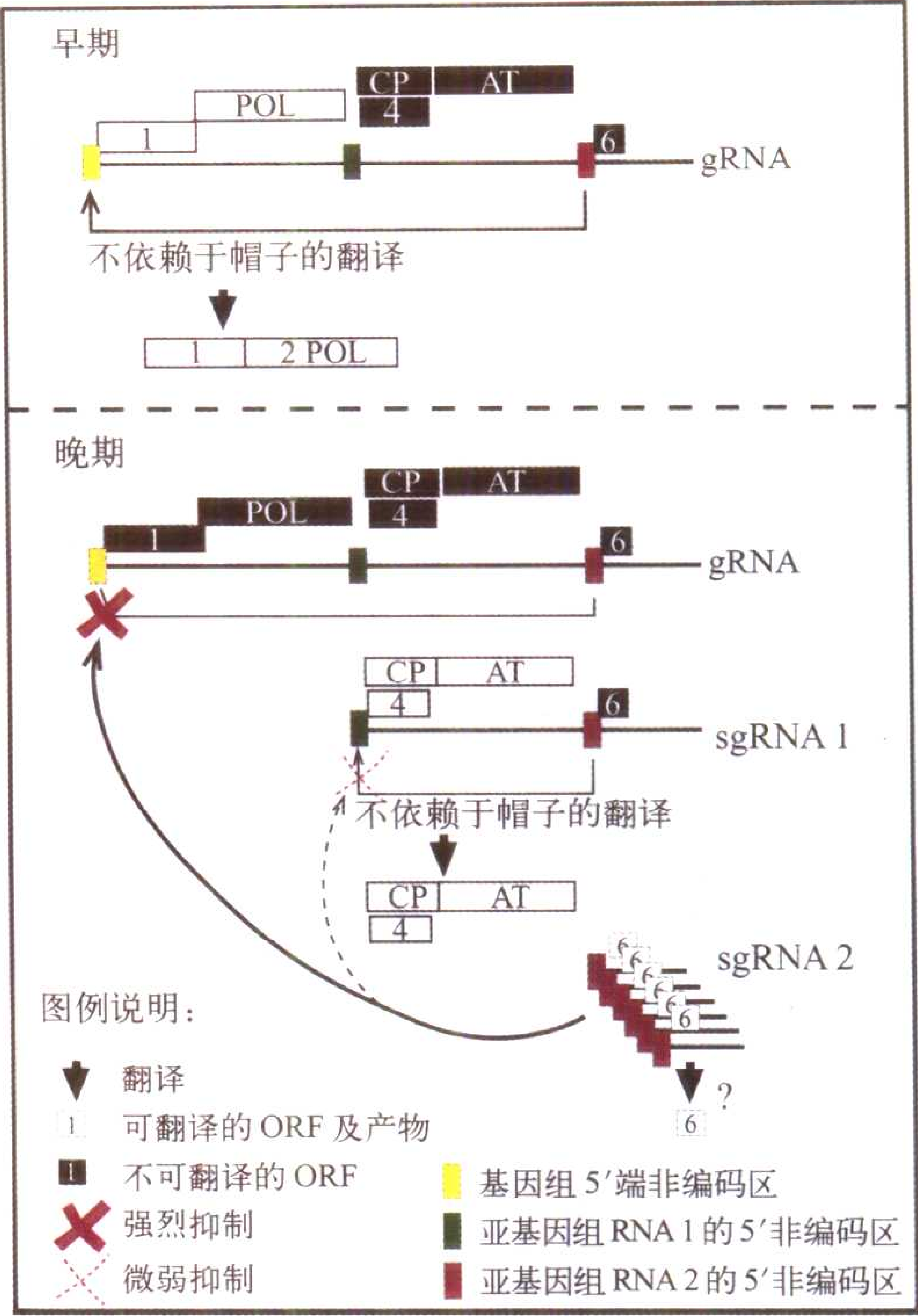


图 7.2　大麦黄矮病毒（BYDV）通过 sgRNA 2 基因表达的反式调控（trans-regulation）的翻译切换（translational switch）模型。（见正文图 7.25 注）

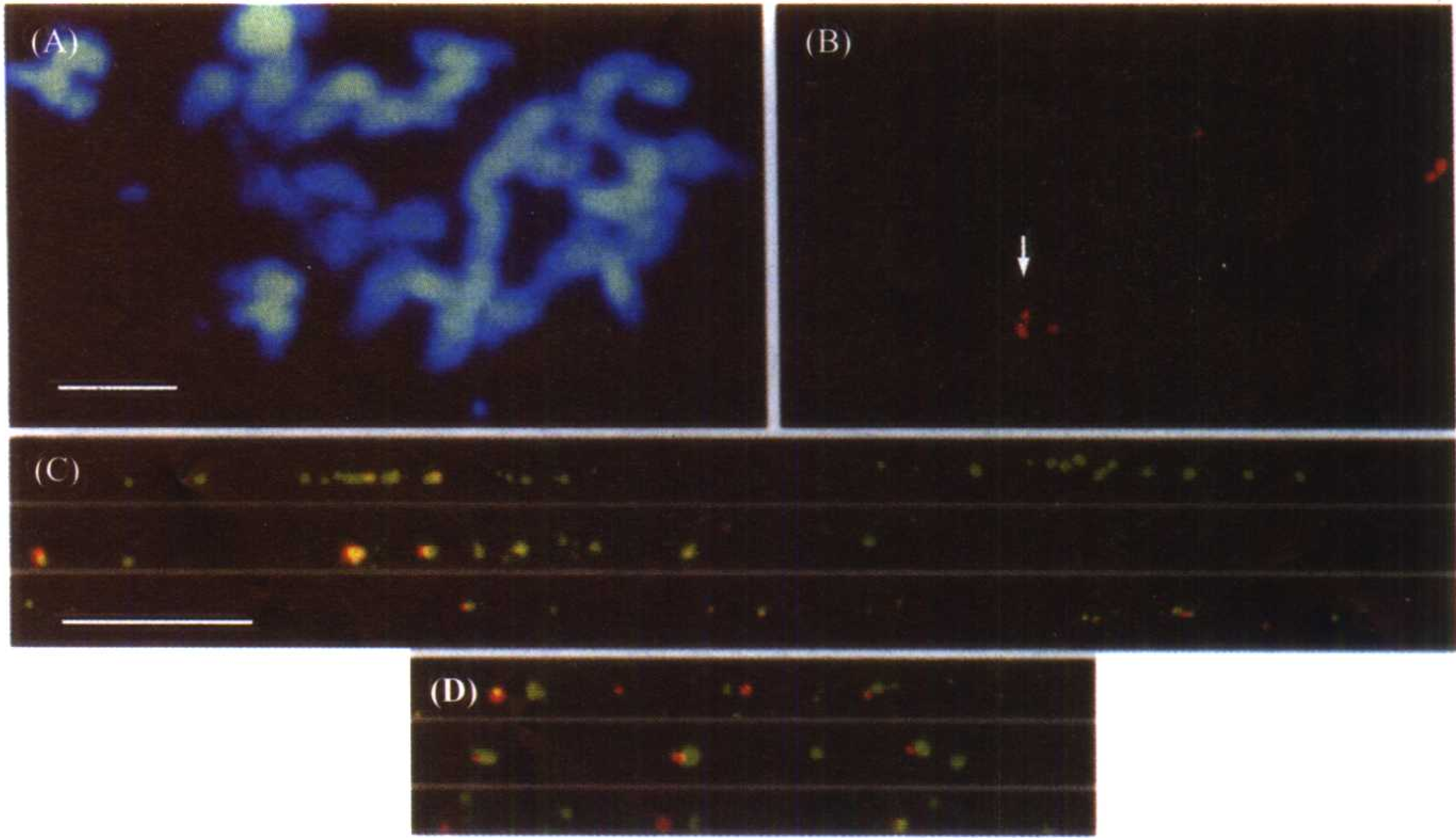


图 8.1　大蕉（*Musa*）品种 Obino l’Ewai 染色体的原位杂交。（见正文图 8.37 注）

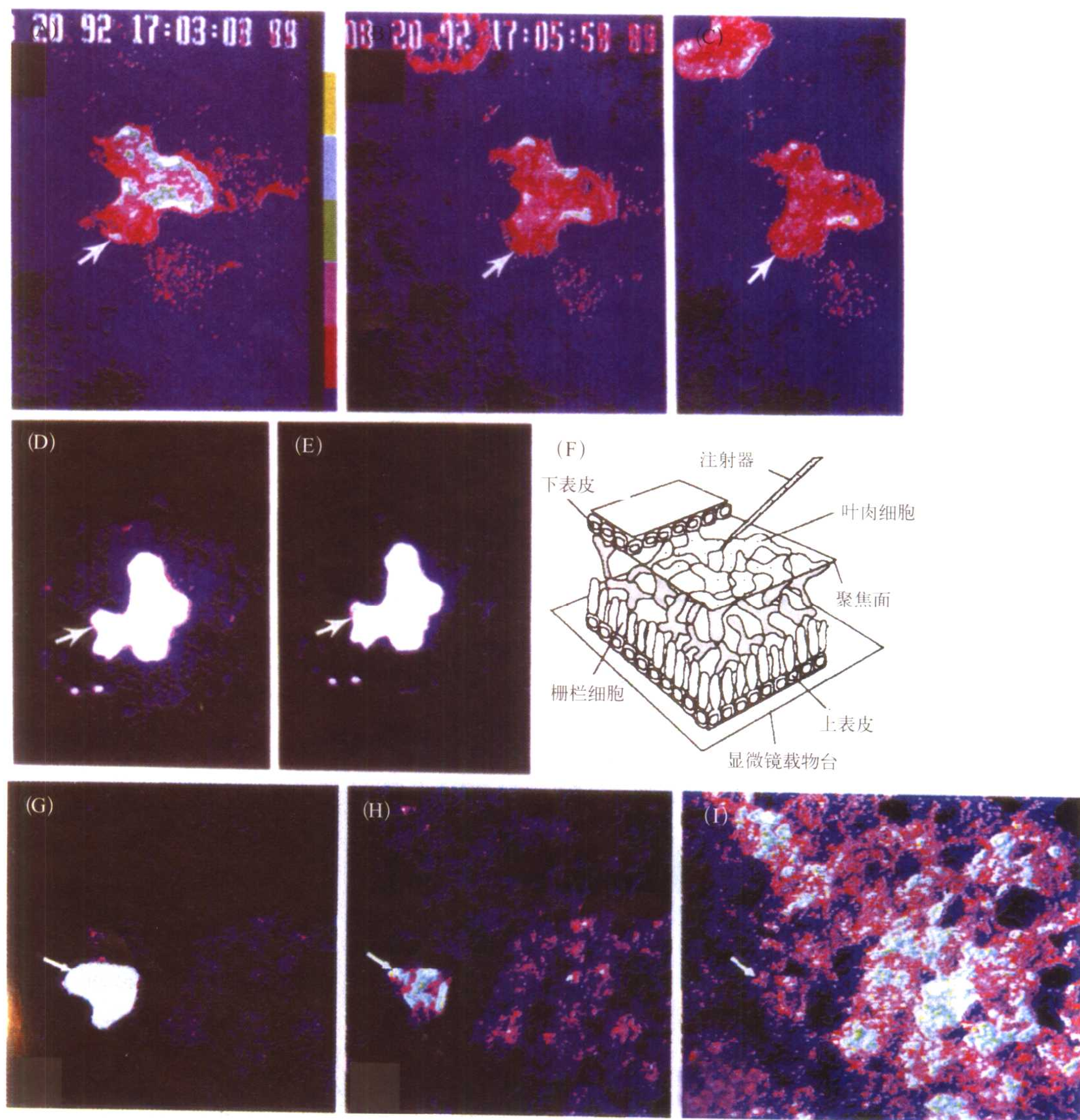


图 9.1 荧光标记的 10 kDa 荧光黄(4-氨基苯邻二甲酰亚胺)葡聚糖［(A)～(E)］或 20 kDa 荧光素异硫氰酸标记的葡聚糖［(G)～(I)］，与 TMV MP［(A)～(C),(G)～(I)］或不与 TMV MP［(D),(E)］一起微注射入成熟烟草叶片的海绵状叶肉细胞。(见正文图 9.4 注)

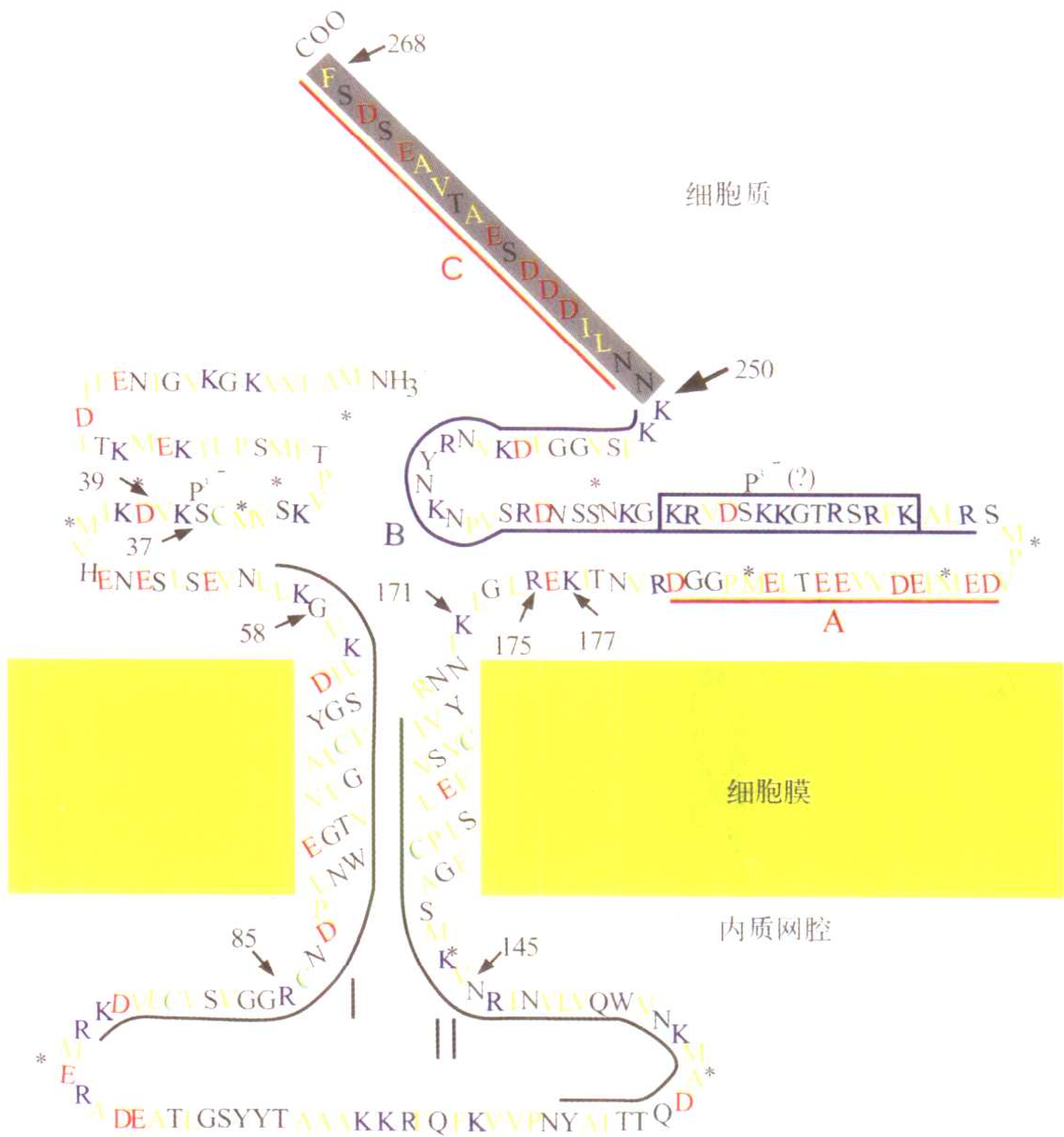


图 9.2　TMV MP 的拓扑结构模型。(见正文图 9.7 注)

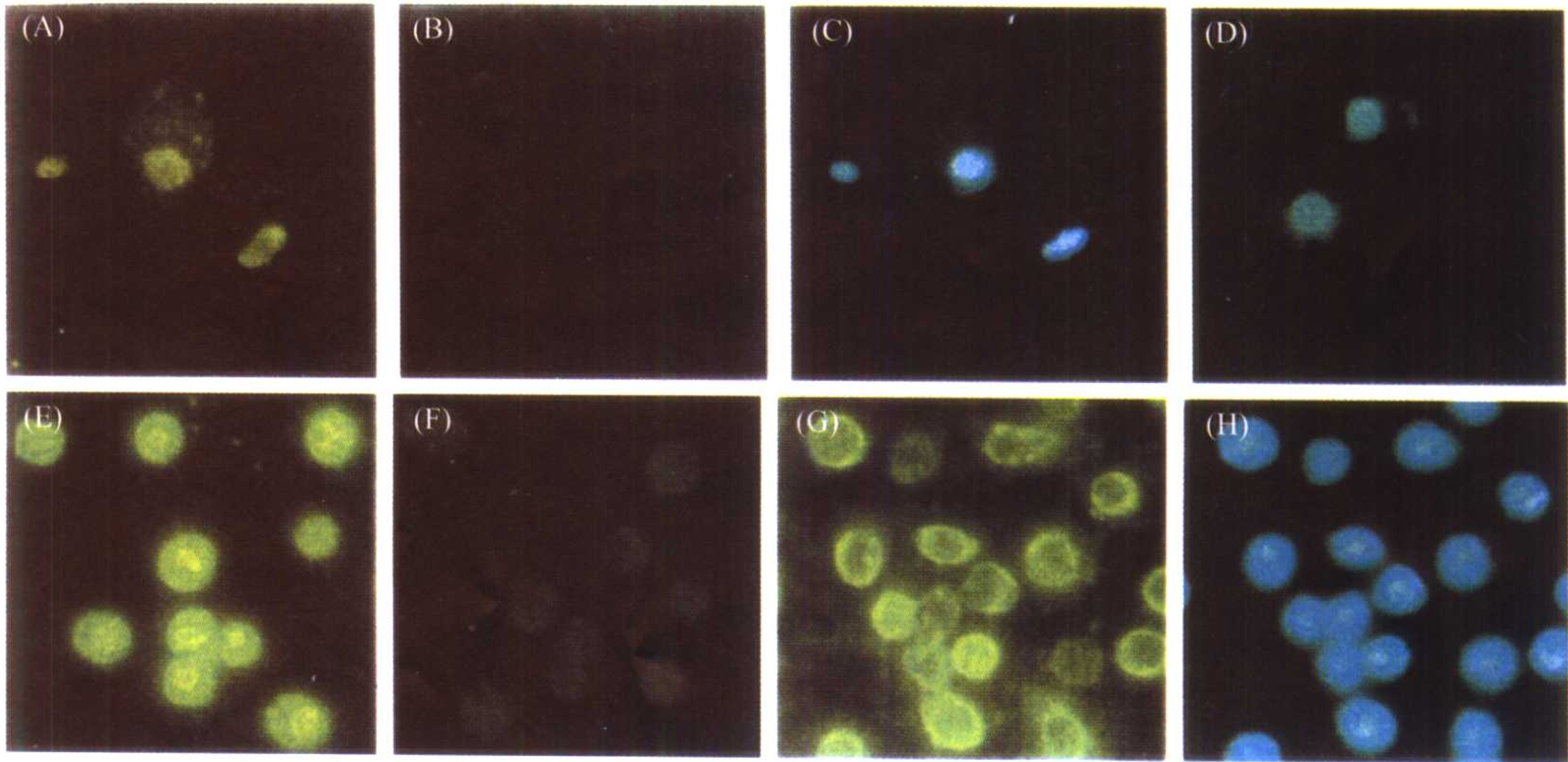


图 9.3　免疫荧光染色确定的MSV 外壳蛋白在烟草原生质体［(A)～(D)］和昆虫细胞［(E)～(H)］中的亚细胞定位。(见正文图 9.11 注)

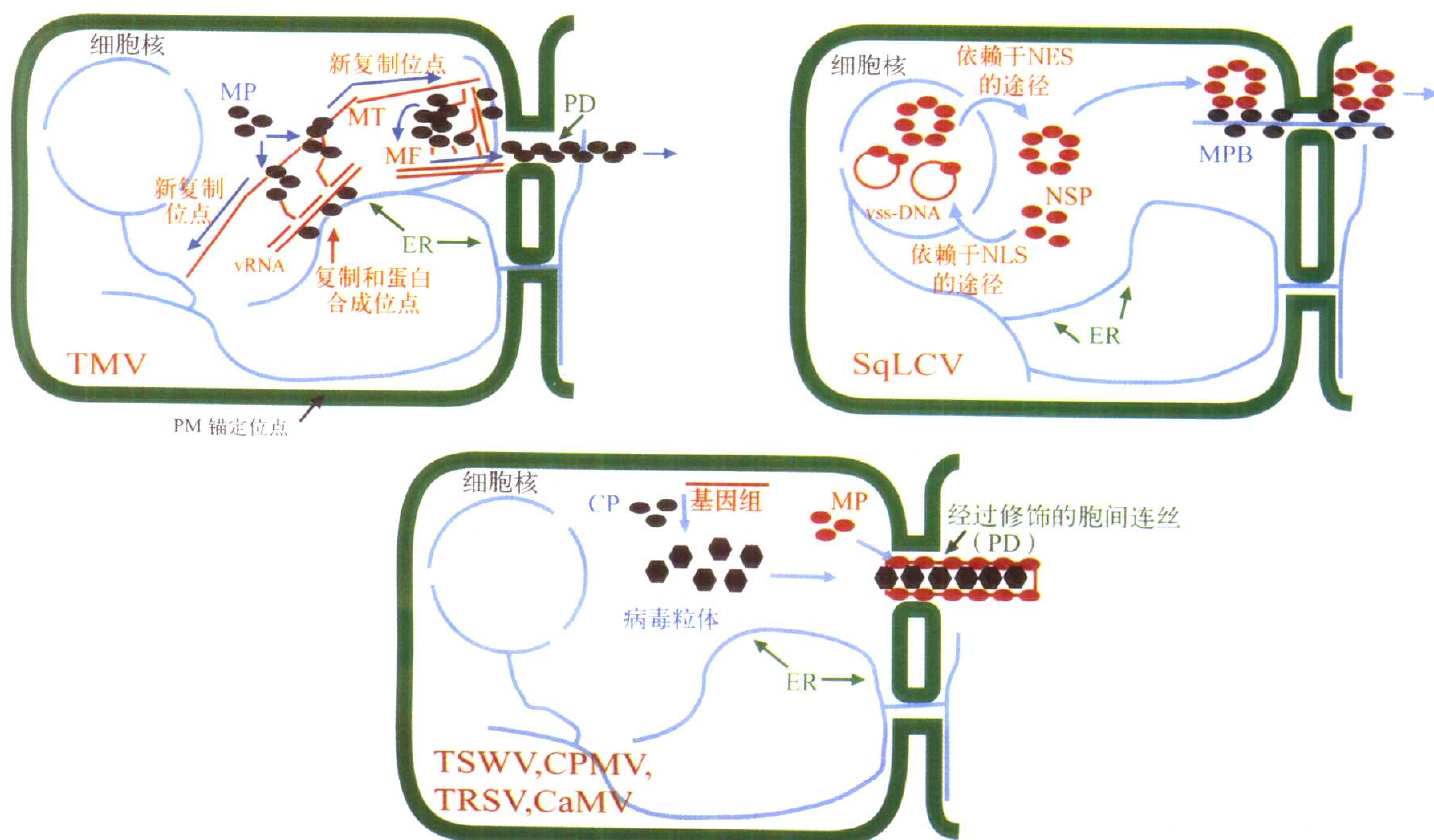


图 9.4　植物病毒细胞内移动模型。(见正文图 9.13 注)

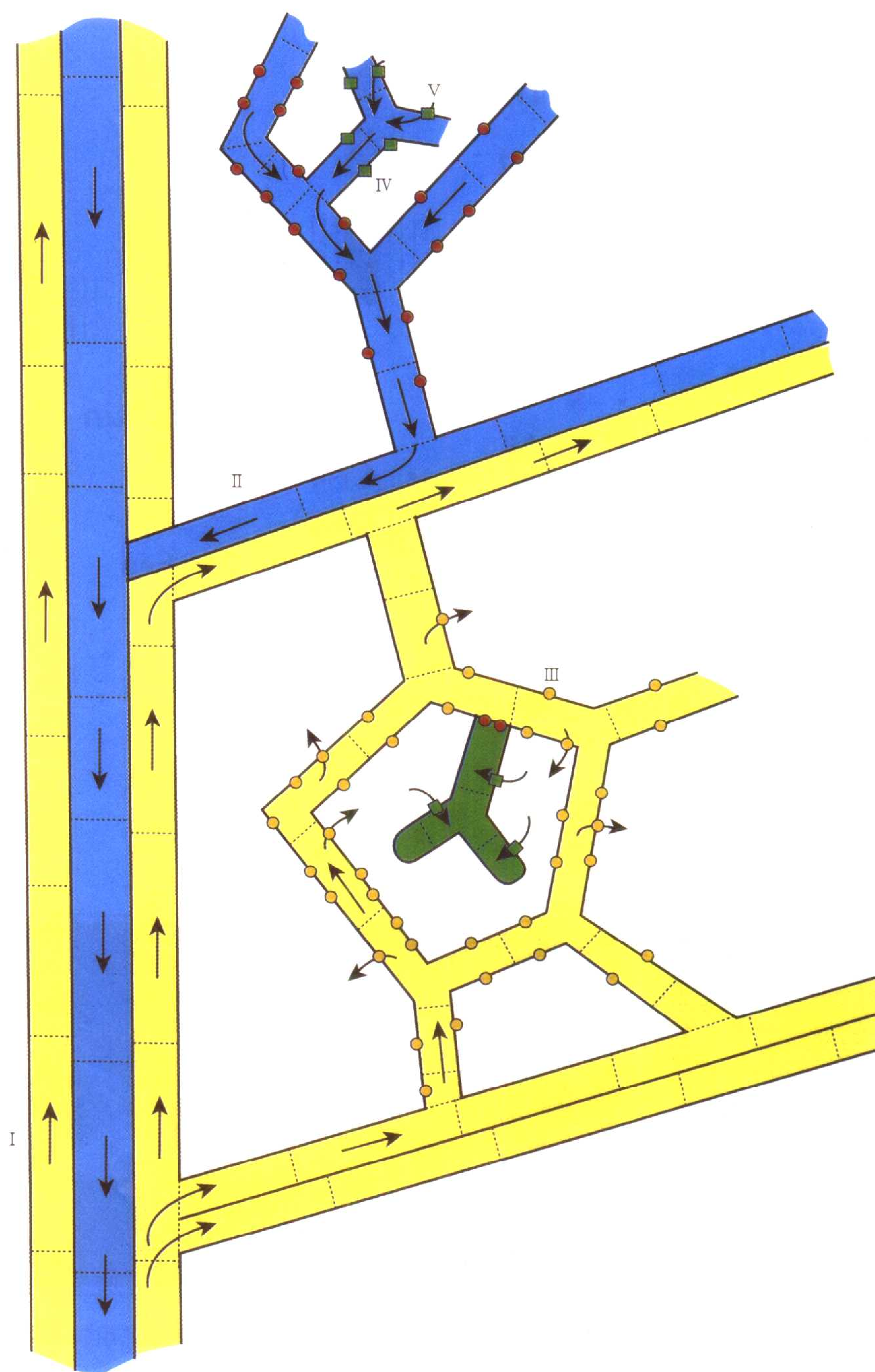


图 9.5　发育中的本生烟叶片由库到源的转换模型。(见正文图 9.17 注)

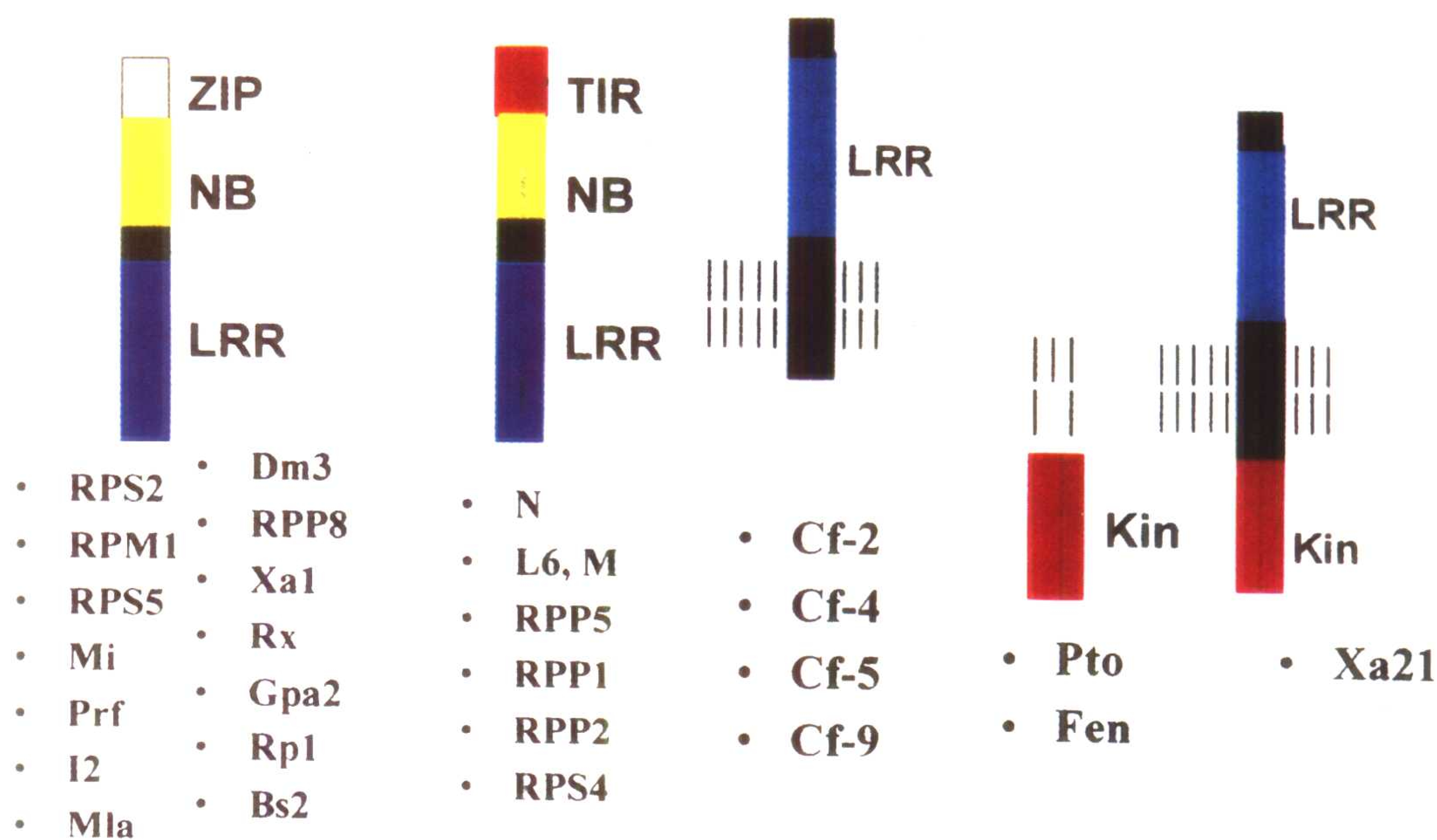


图 10.1　5 类 *R*（抗病）基因的结构。（见正文图 10.2 注）

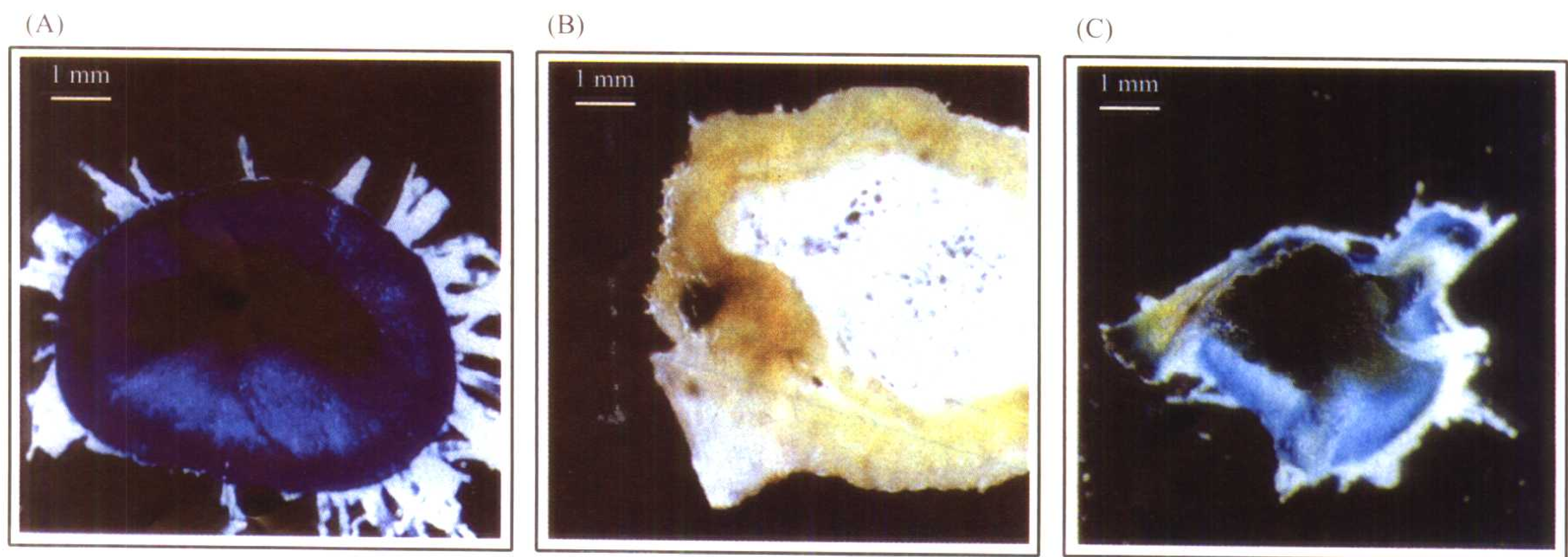


图 10.2　在分别发生沉默和非沉默的烟草植株的分生组织中，对 *uidA* 基因表达的组织化学分析。（见正文图 10.17 注）

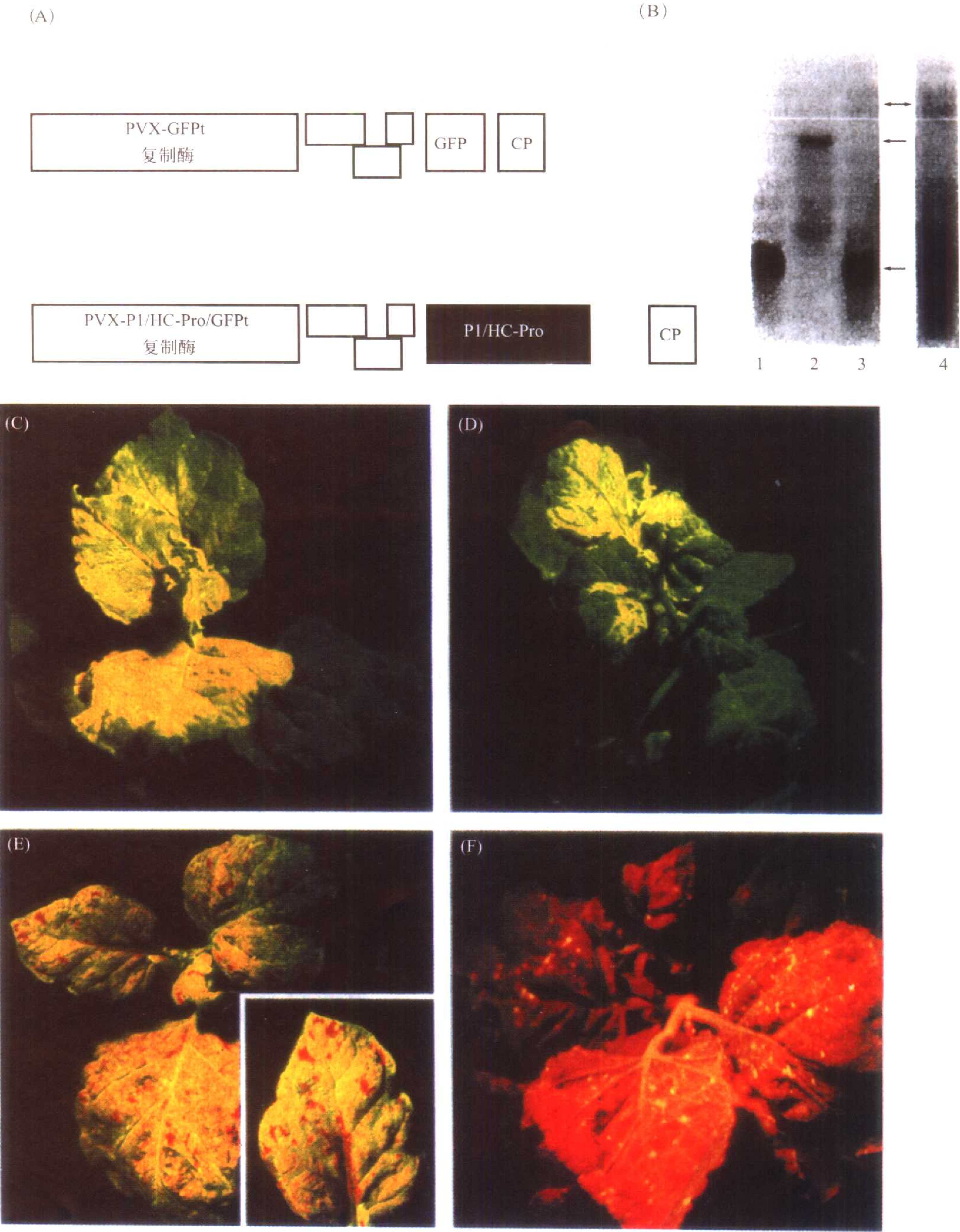


图 10.3　在病毒混合侵染时转基因编码的 GFP 受到病毒诱导的基因沉默作用(VIGS)。(见正文图 10.19 注)

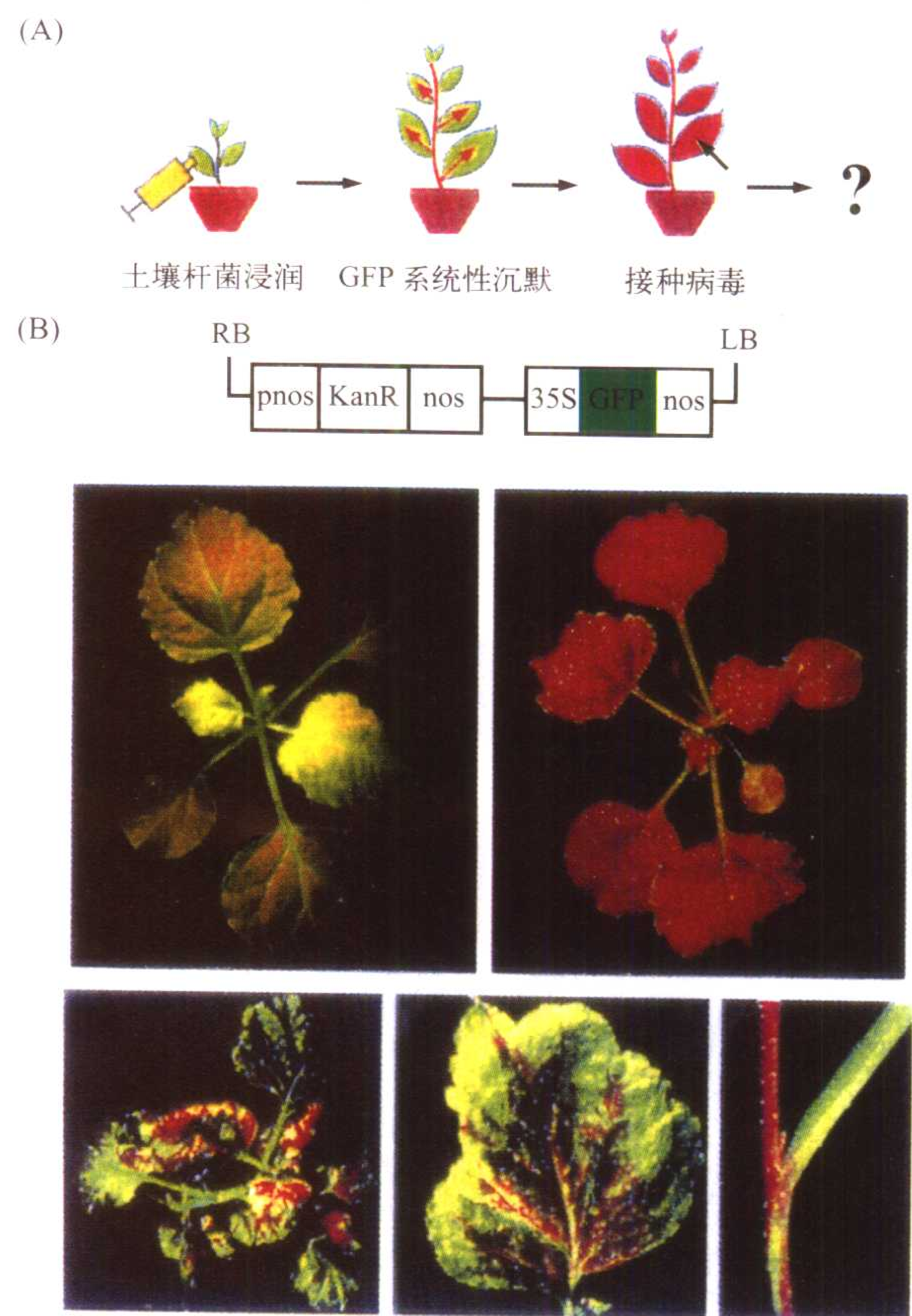


图 10.4　通过土壤杆菌（*A. tumefaciens*）浸润诱发的对植株中 GFP 转基因的 PTGS 以及随后由 PVY 侵染产生的对 PTGS 的抑制作用。(见正文图 10.20 注)

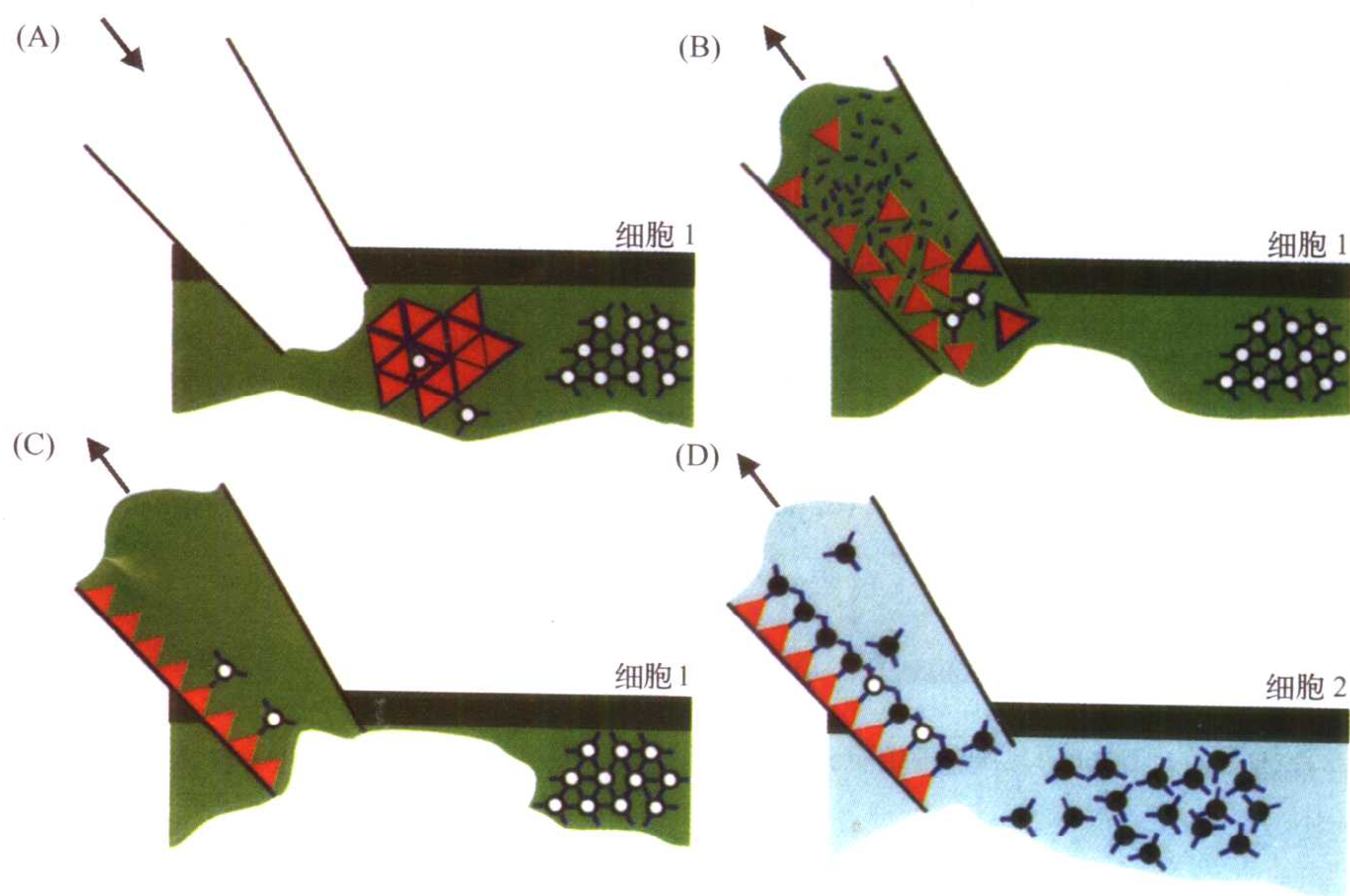


图 11.1　蚜虫从受侵染细胞取食后相继获得 CaMV 的模型。(见正文图 11.10 注)

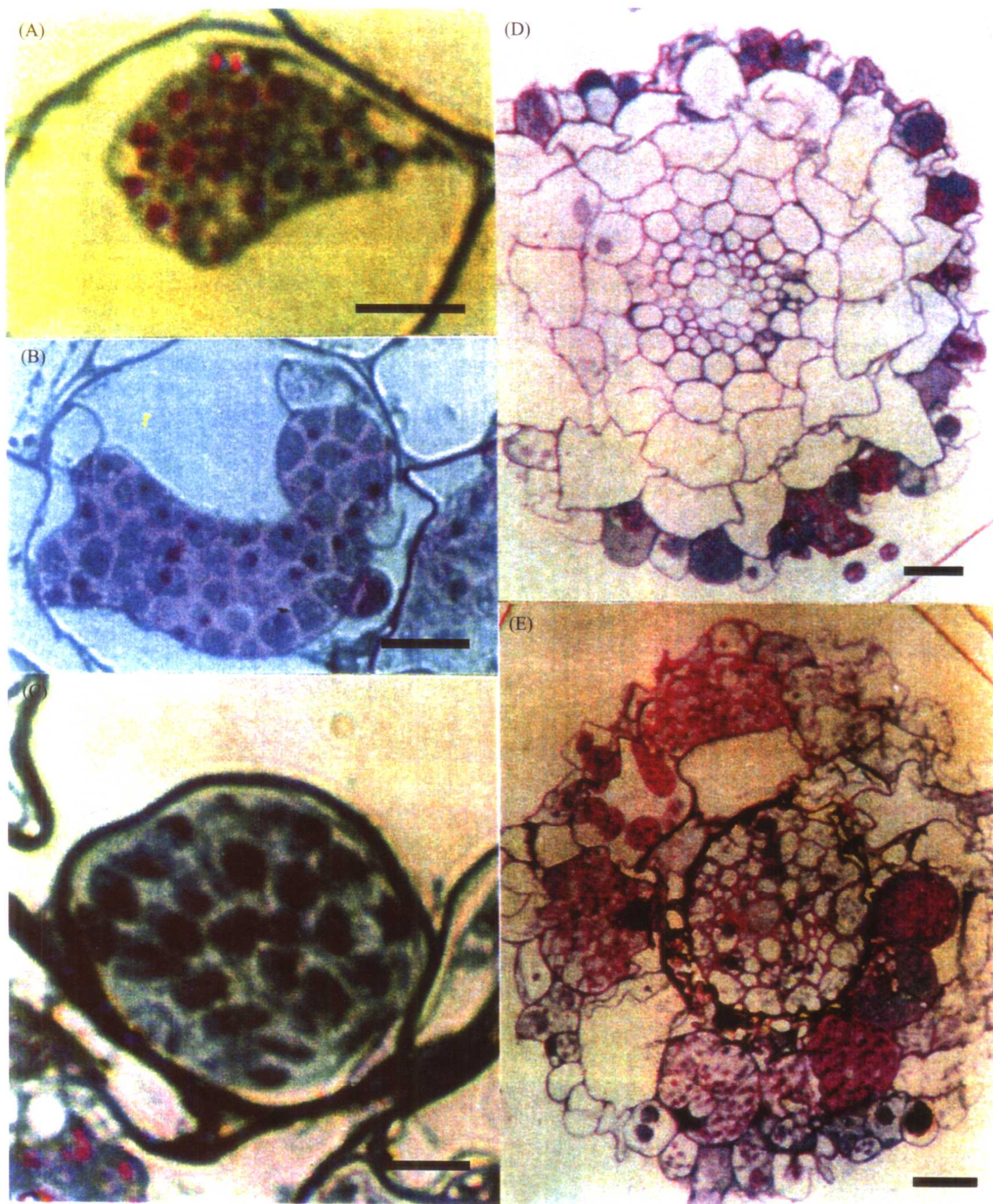


图 11.2　甜菜多黏菌（P. betae）对甜菜根部的侵染。(见正文图 11.23 注)

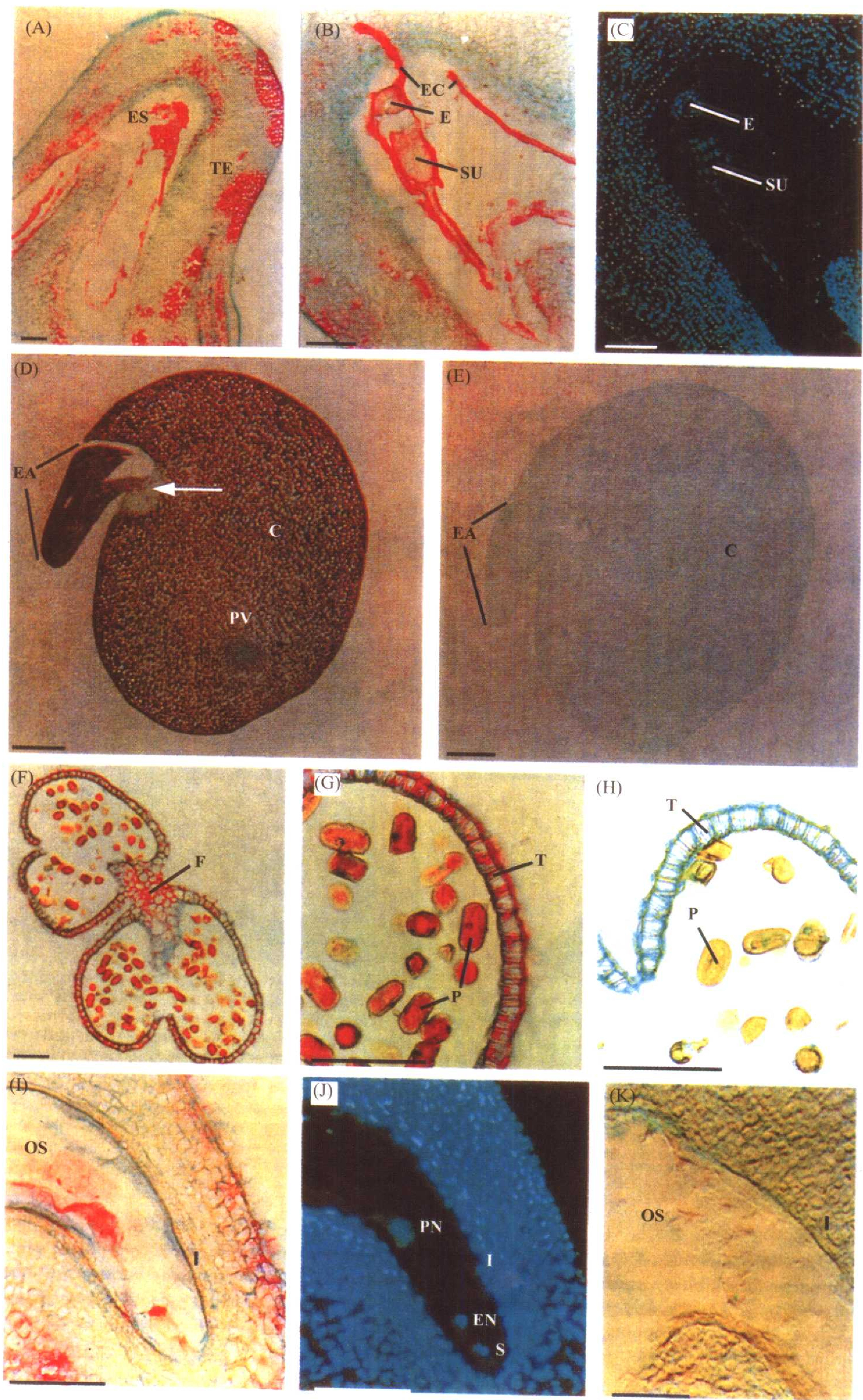
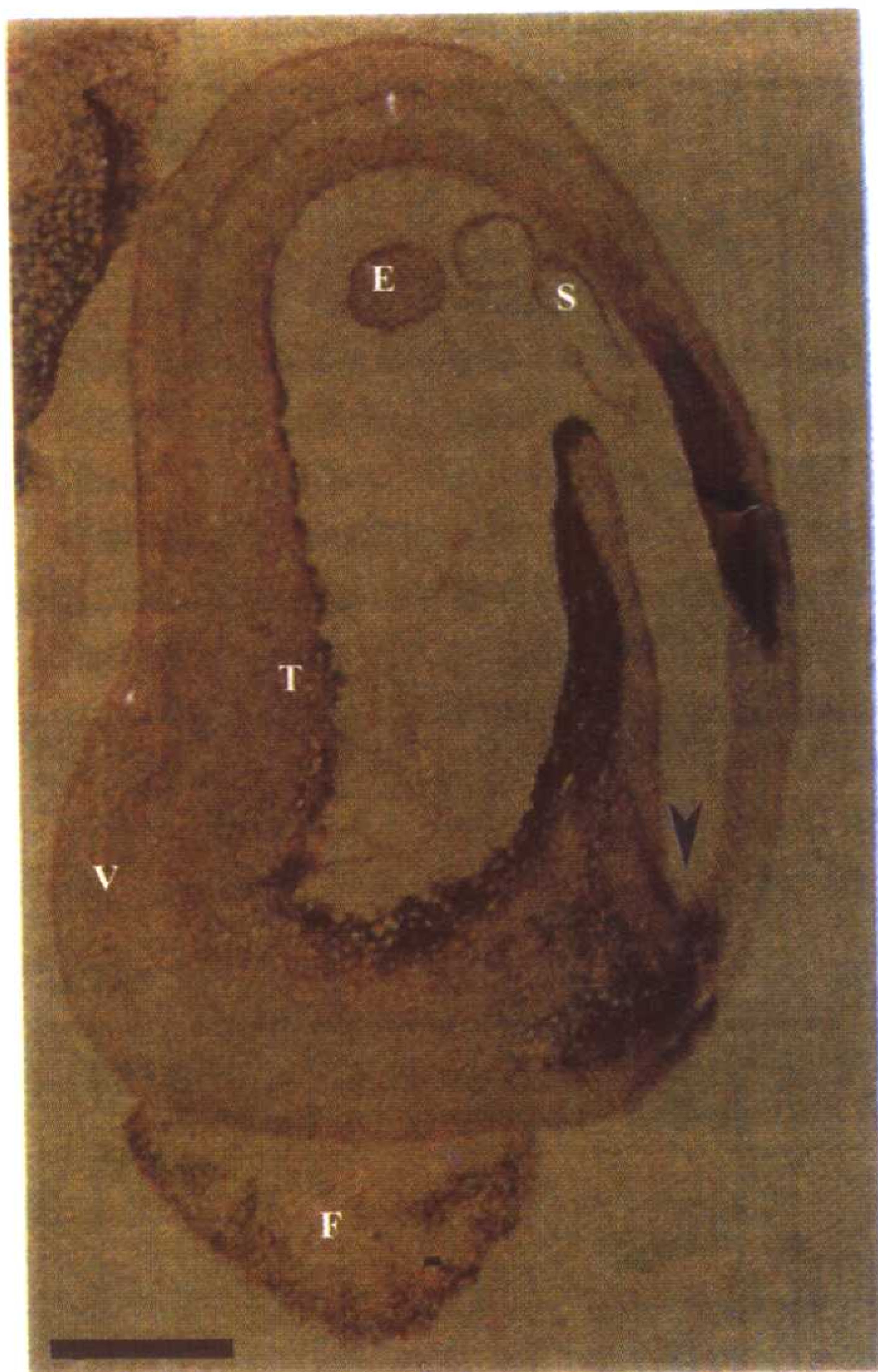
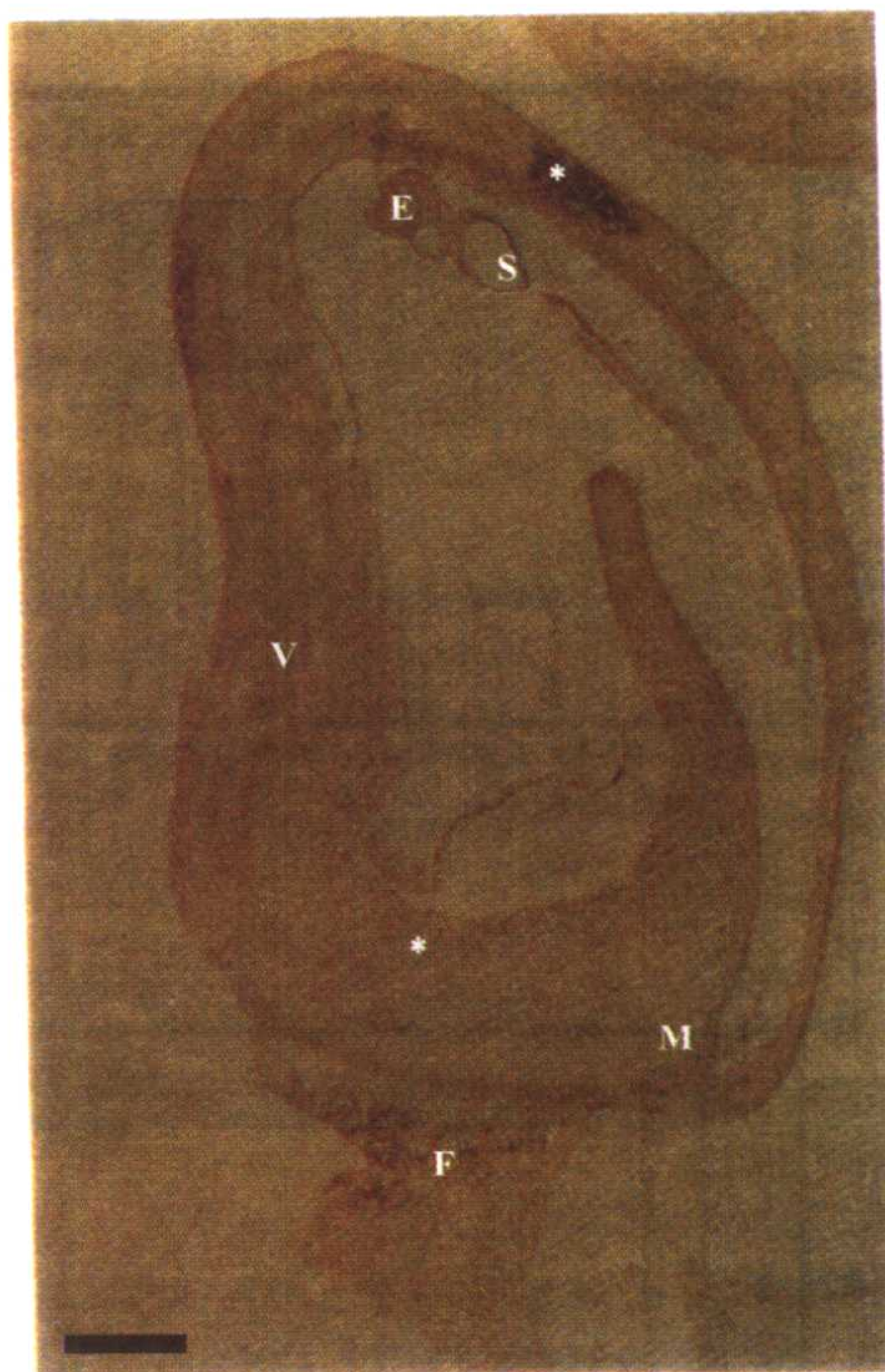


图 12.1　在豌豆的胚和配子中检测 PEBV。(见正文图 12.7 注)

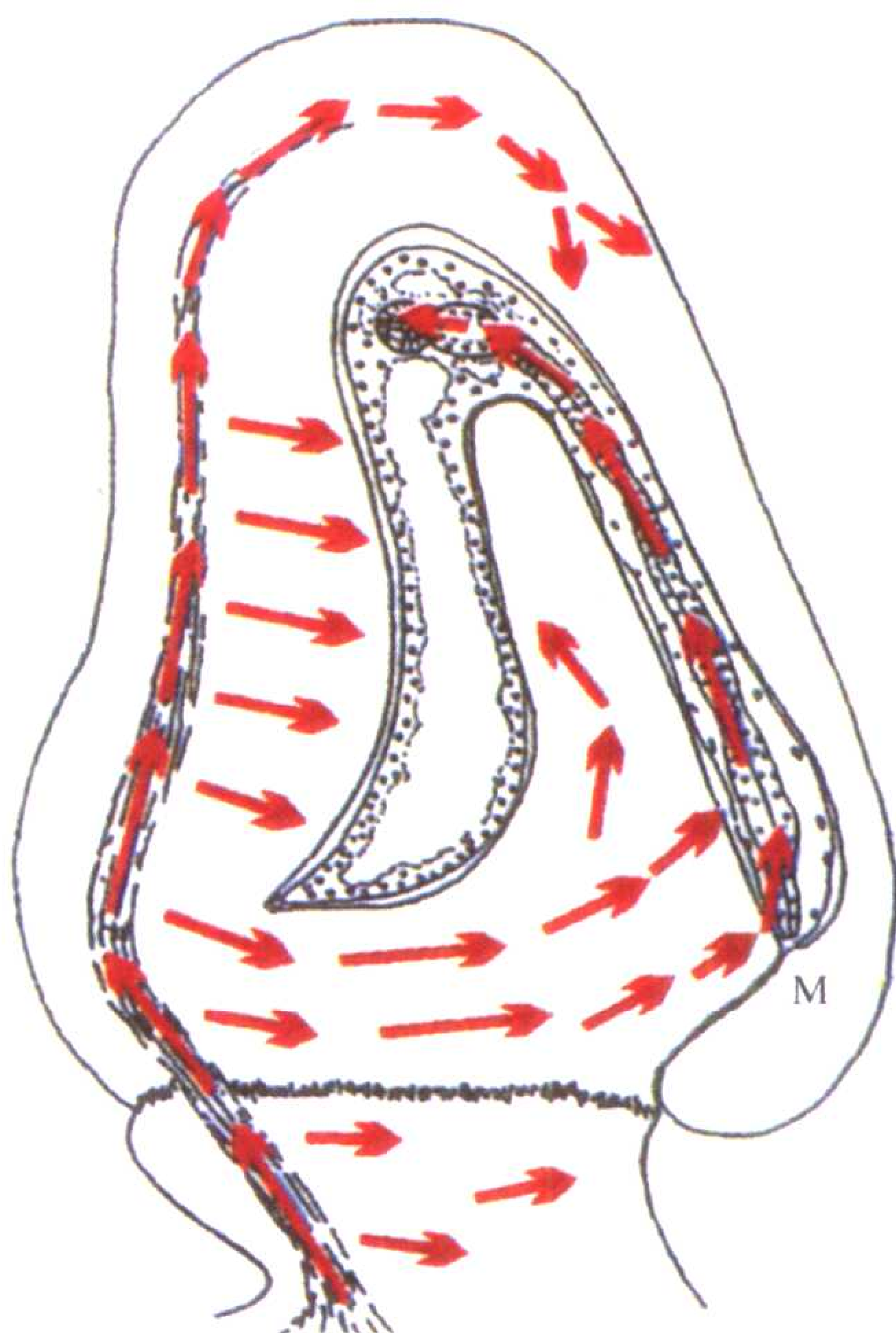
(A)



(B)



(C)



(D)

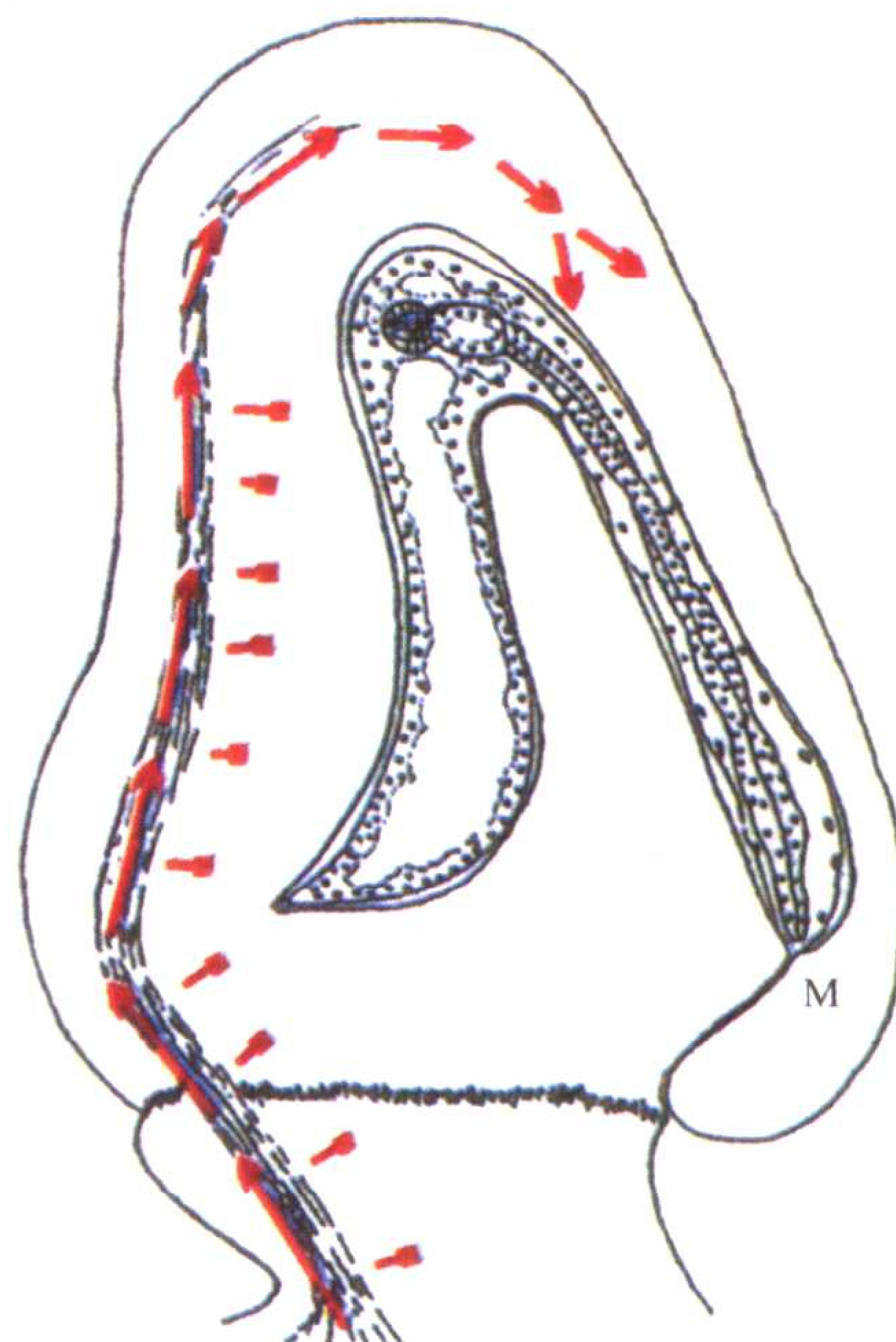


图 12.2　豌豆种子传播 PSbMV 的途径。(见正文图 12.8 注)



图 12.3　一处甜菜地的航拍图（aerial view），成片的植株受病毒性黄症［BYV 和(或)BMYV］的侵染以及侵染从这些发病片向外扩散的梯度。(见正文图 12.10 注)

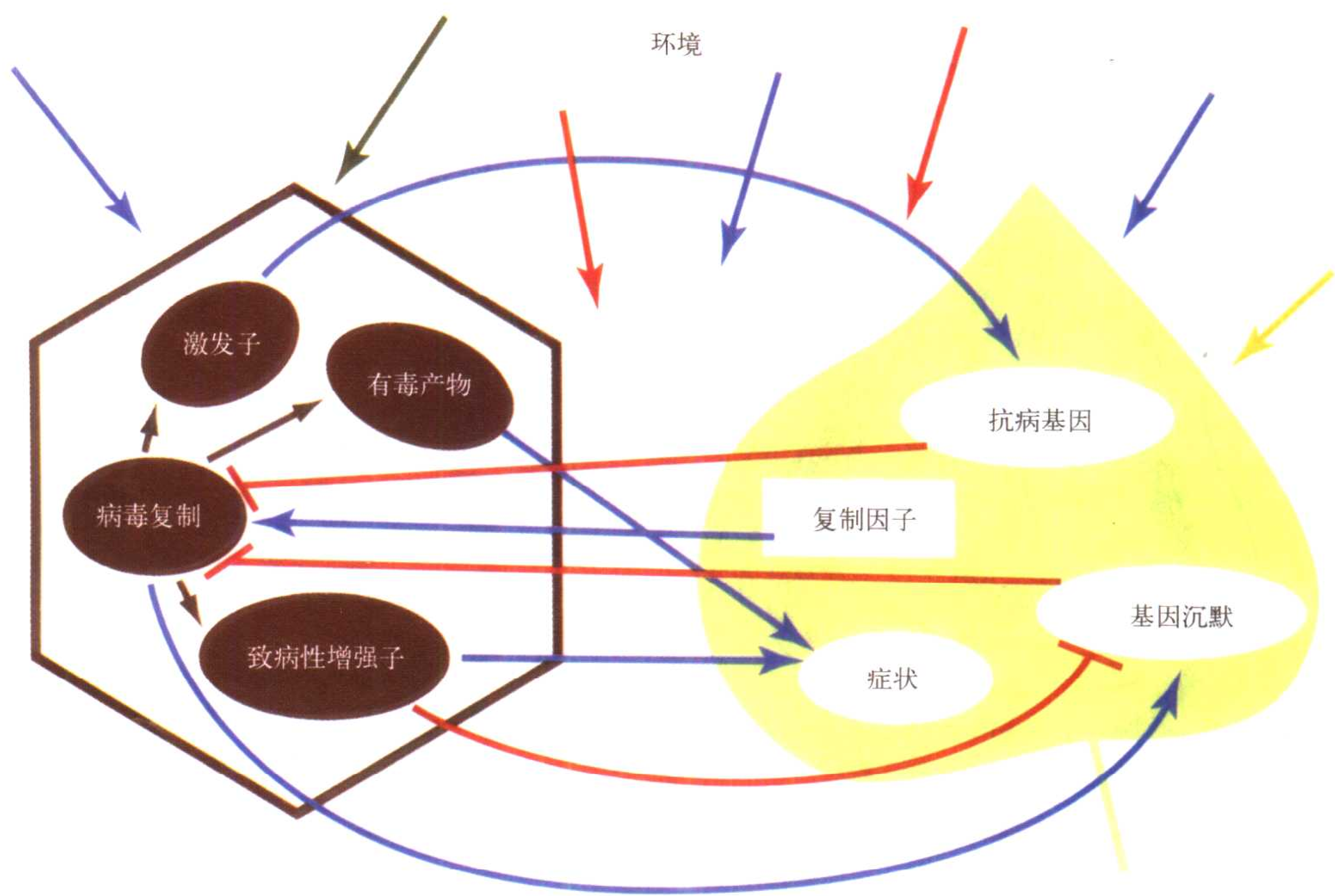


图 13.1　本图说明病毒侵染是侵袭、防卫与对抗防卫的综合结果。(见正文图 13.1 注)

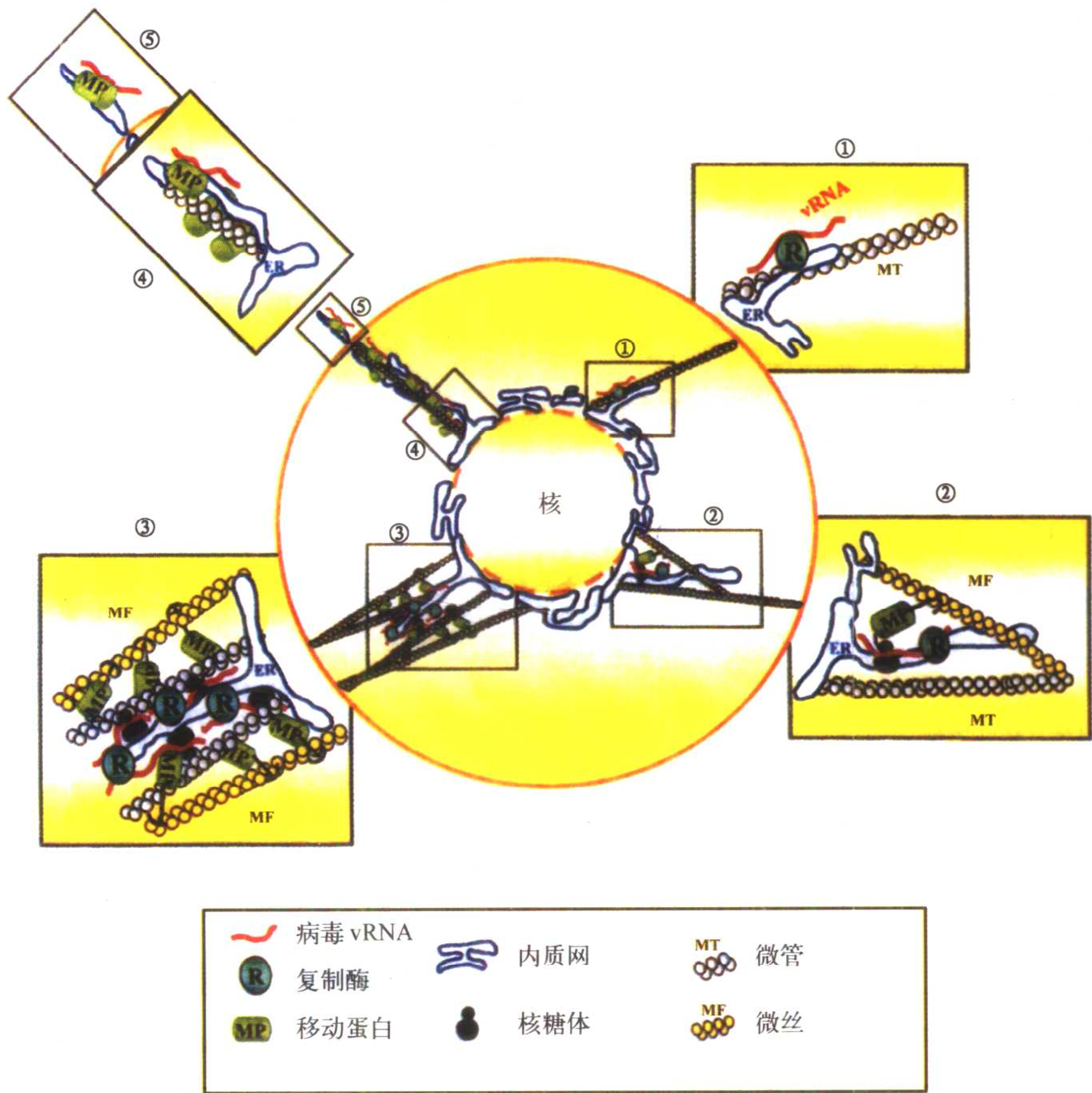


图 13.2　TMV 侵染烟草 BY2 原生质体的模型。(见正文图 13.3 注)

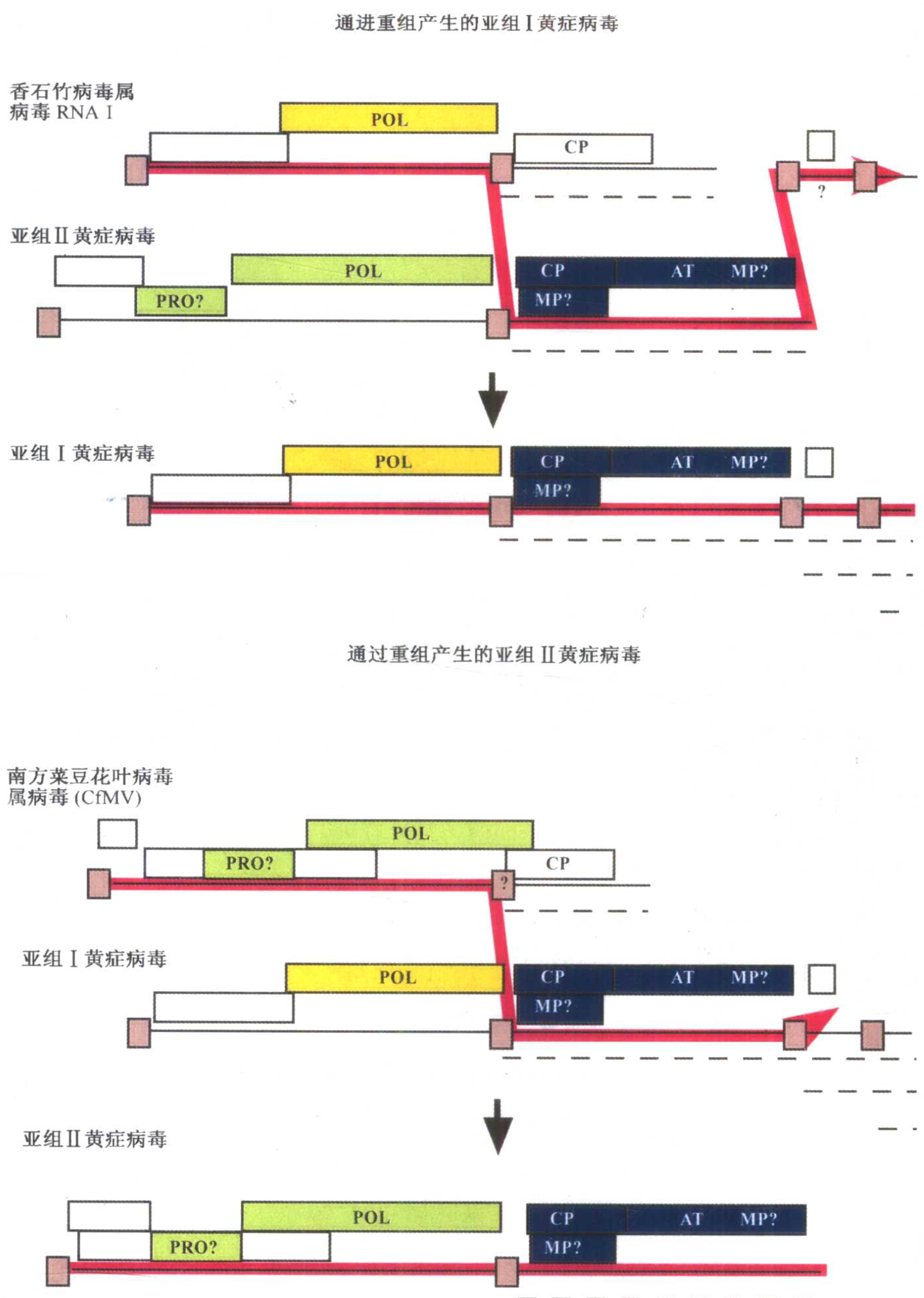


图 17.1　黄症病毒各亚组的起源模型。(见正文图 17.13 注)

［Ｇｅｎｅｒａｌ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ］
书名＝马修斯植物病毒学（原书第四版）
页数＝１０７４
ＳＳ号＝１１８１８３１６